

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA



**CARACTERIZACIÓN DE COMUNIDADES MICROBIANAS CON POTENCIAL
BIOTECNOLÓGICO PARA LA PREVENCIÓN DEL DETERIORO ESTRUCTURAL.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGIA**

PRESENTA

M en C. LEANDRO ALBERTO PÁRAMO AGUILERA

REYNOSA, TAMAULIPAS

MAYO 2012

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA



**CARACTERIZACIÓN DE COMUNIDADES MICROBIANAS CON POTENCIAL
BIOTECNOLÓGICO PARA LA PREVENCIÓN DEL DETERIORO ESTRUCTURAL.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

M en C. LEANDRO ALBERTO PÁRAMO AGUILERA

REYNOSA, TAMAULIPAS.

MAYO 2012



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Reynosa, Tamaulipas el día 11 del mes Mayo del año 2012, el (la) que suscribe **LEANDRO ALBERTO PARAMO AGUILERA** alumno (a) del Programa de Doctorado en Ciencias en Biotecnología con número de registro **A090054**, adscrito al Centro de Biotecnología Genómica, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. José Alberto Narváez Zapata y Dr. Benjamín Otto Ortega Morales y cede los derechos del trabajo intitulado “Caracterización de comunidades microbianas con potencial biotecnológico para la prevención del deterioro estructural”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección Bldv. del Maestro esq. con Elías Piña S/N Col. Narciso Mendoza, C.P. 88710 Cd. Reynosa Tamaulipas México Tels. 01 (899) 924-36-27 y 01 (899) 925-16-56. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


Leandro Alberto Paramo Aguilera



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Reynosa, Tamaulipas siendo las _____ horas del día _____ del mes de _____ del 2012 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de _____ CBG para examinar la tesis titulada:

“Caracterización de comunidades microbianas con potencial biotecnológico para la prevención del deterioro estructural”

Presentada por el alumno:

<u>Paramo</u> Apellido paterno	<u>Agullera</u> Apellido materno	<u>Leandro Alberto</u> Nombre(s)
Con registro:		
A	0	9
0	0	5
4		

aspirante de:

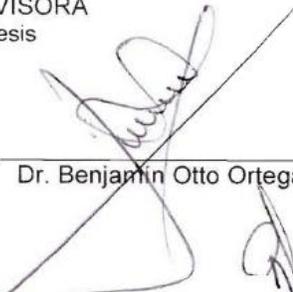
Doctorado en Ciencias en Biotecnología en RED

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA Directores de tesis



Dr. José Alberto Narváez Zapata



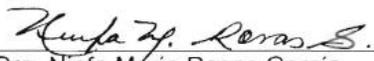
Dr. Benjamín Otto Ortega Morales



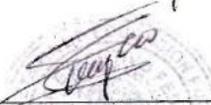
Dra. Claudia Patricia Larralde Corona



Dr. Miguel Ángel Reyes López



Dra. Ninfa María Rosas García

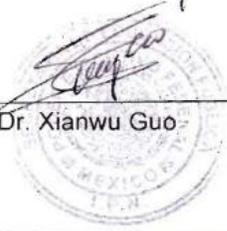


Dr. Xianwu Guo

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO



Dra. Ninfa María Rosas García



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA
GENÓMICA

ÍNDICE

SECCIÓN	PÁGINA
AGRADECIMIENTOS.....	IV
DEDICATORIA.....	V
LISTA DE FIGURAS.....	VI
LISTA DE CUADROS.....	XI
RESUMEN.....	XII
ABSTRACT.....	XIV
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2 ANTECEDENTES.....	4
2.1 ZONA DE ESTUDIO, CASTILLO DE CHAPULTEPEC.....	4
2.2 GENERALIDADES SOBRE LAS BIOPELÍCULAS MICROBIANAS.....	6
2.3 IMPLICACIONES EN EL BIODETERIORO DEL PATRIMONIO CULTURAL POR BIOPELÍCULAS.....	7
2.3.1. <i>Análisis de diversidad microbiana</i>	8
2.3.2. <i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i>	8
2.3.3. <i>Utilización de oligonucleótidos universales para el estudio de las subunidades ribosomales microbianas</i>	9
2.4 CRECIMIENTO Y FORMACIÓN DE LA BIOPELÍCULA.....	10
2.5 CINÉTICA DEL CRECIMIENTO MICROBIANO.....	12
2.6 BIOPRECIPITACIÓN DE CARBONATOS DE CALCIO.....	12
2.7 TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE LA CONFORMACIÓN DE LA ROCA EN MONUMENTOS.....	16
2.7.1 <i>Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) y Difracción de rayos X (EDX)</i>	16
3. JUSTIFICACIÓN.....	18
4. HIPÓTESIS.....	19
5. OBJETIVOS.....	19
5.1. OBJETIVO GENERAL.....	19
5.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	19
6 MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
6.1 DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE MUESTREO.....	20
6.2 TOMA DE MUESTRAS Y AISLAMIENTO MICROBIOLÓGICO.....	20
6.2.1. <i>Aislamiento e identificación de microorganismos presentes en la muestra</i>	21
6.3 EXTRACCIÓN DE ADN.....	22
6.4 DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD DEL ADN POR ELECTROFORESIS.....	23
6.5 PROTOCOLOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LOS HONGOS EN ESTUDIO.....	24
6.5.1 <i>ADN utilizado y oligonucleótidos empleados para las amplificaciones</i>	24
6.5.2 <i>Amplificaciones por PCR para levaduras y hongos filamentosos</i>	24

6.5.3	<i>Amplificaciones por rep-PCR</i>	25
6.5.4	<i>Amplificaciones por eric-PCR</i>	25
6.6	SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS.....	25
6.7	POTENCIAL DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA Y BIOMINERALIZACIÓN DE LAS ESPECIES OBTENIDAS A PARTIR DE LAS BIOPELÍCULAS COLECTADAS	27
6.7.1.	<i>Ensayo de formación de la biopelícula por teñido con cristal violeta en placa</i>	28
6.7.2.	<i>Cinética del crecimiento microbiano</i>	29
6.8	PRUEBA DE UREASA.....	30
6.9.	ENSAYO DE BIOPRECIPITACIÓN DE CARBONATOS.....	31
7.	RESULTADOS	33
7.1	ZONA DE MUESTREOS	33
7.2	IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS	34
7.3	IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS	39
7.4	IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS.....	41
7.5	IDENTIDAD MOLECULAR DE MICROORGANISMOS AISLADOS E IDENTIFICADOS.....	43
7.5.1.	<i>Identidad molecular de hongos en general (Filamentosos y levaduriformes)</i>	43
7.5.2.	<i>Análisis de haplotipos rep-PCR y eric-PCR</i>	46
7.5.3.	<i>Identificación de hongos en general (filamentosos y levaduriformes) aislados por análisis de la secuencia ribosomal 26 S</i>	50
7.5.4.	<i>Identidad molecular de aislados bacterianos</i>	56
7.6.	IDENTIFICACIÓN DE AISLADOS BACTERIANOS POR ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS RIBOSOMALES 16S Y COM	59
7.7	ENSAYO DE FORMACIÓN DE LA BIOPELÍCULA EN MICRO PLACA.....	66
7.7.1	<i>Fase 1: Primer ensayo para la formación de biopelículas</i>	66
7.7.2	<i>Fase 2. Segundo ensayo para la formación de biopelículas</i>	71
7.8	CINÉTICA DE CRECIMIENTO MICROBIANO	72
7.9	BIOPRECIPITACIÓN DE CARBONATOS DE CALCIO	76
7.10	DIFRACCIÓN DE RAYOS X Y MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO DE LOS AISLAMIENTOS FORMADORES DE BIOPELICULAS Y BIOPRECIPITADORES DE CRISTALES DE CARBONATO DE CALCIO	81
7.11.	POSIBLE PARTICIPACIÓN DE LAS ESPECIES AISLADAS EN PROCESOS DE BIODETERIORO Y/O POTENCIAL PARA EL DESARROLLO DE FUTUROS PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS.....	88
8	DISCUSIÓN	91
8.1	TOMA DE MUESTRAS.....	91
8.2	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS.....	91
8.3	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS LEVADURIFORMES	94
8.4	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS.....	94
8.5	IDENTIDAD MOLECULAR DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS.....	95
8.6	ENSAYO DE FORMACIÓN DE LA BIOPELÍCULA EN PLACA	102
8.6.1	<i>Fase 1: Primer ensayo para la formación de biopelículas</i>	102
8.6.2	<i>Fase 2: Segundo ensayo para la formación de biopelículas</i>	104
8.7	CINÉTICA DE CRECIMIENTO MICROBIANO	105
8.8	BIOPRECIPITACIÓN DE CARBONATOS DE CALCIO	107
8.8.1	<i>Prueba de ureasa</i>	107
8.8.2	<i>Ensayos de bioprecipitación</i>	109
8.9	DIFRACCIÓN DE RAYOS X Y MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO.....	111
8.10	ANÁLISIS DE PARTICIPACIÓN EN BIODETERIORO Y/O POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LOS AISLADOS OBTENIDOS.....	113

9. CONCLUSIONES	115
10 RECOMENDACIONES	118
11 BILIOGRAFIA	120
12 APÉNDICES	140
12.1. APÉNDICE A. SECUENCIAS PROCESADAS PARA LOS AISLADOS OBTENIDOS EN LAS DIFERENTES BIOPELÍCULAS MUESTREADAS.	140
12.2. APÉNDICE B. FOTOGRAFÍAS DE LOS AISLADOS PUROS, DEL PROCESO DE IDENTIFICACIÓN DE HONGOS Y BACTERIAS Y DE LA BIOPRECIPITACIÓN DE CRISTALES DE CARBONATO DE CALCIO POR PARTE DE LOS AISLADOS BACTERIANOS.....	143
12.3. APÉNDICE C. ARTÍCULOS ELABORADOS A PARTIR DE LA INFORMACIÓN GENERADA POR ESTA INVESTIGACIÓN.	151
12.3.1 <i>Aislamiento e identificación de microorganismos en biopelículas provenientes del Castillo de Chapultepec, Ciudad de México.....</i>	<i>151</i>
12.3.2 <i>Culturable fungi associated with urban stone surfaces in Mexico City.....</i>	<i>151</i>
12.3.3 <i>Molecular diversity and biogeochemical activity potential of heterotrophic epilithic microflora.....</i>	<i>151</i>
13. GLOSARIO	152

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a Dios por haberme dado la oportunidad de llegar hasta este momento con vida y con la salud de que me ha dotado para poder arribar a esta meta de mi formación profesional.

Al mismo tiempo deseo patentar mi gratitud al pueblo y gobierno de México, quienes no solo me han dado parte de sus recursos materiales e intelectuales, sino que me han dado de su amor como pueblo y en todo tiempo me hicieron sentir parte de este maravilloso país.

Especial agradecimiento dedico a mi esposa e hijos, quienes han llorado junto conmigo a lo largo de estos años en que hemos estado separados por la distancia, pero cada día mas unidos en el amor y el cumplimiento de este propósito. Son ellos los verdaderos dueños de este título y con ellos estaré eternamente en deuda por este tiempo que no les pude dedicar físicamente.

A mis compañeros del Laboratorio de Biotecnología Industrial (LBI), del Centro de Biotecnología Genómica (CBG): Isabel Rodríguez, Erika de La Cruz, Amanda Olivas, Francisco de la Torre, Iván Rosas, Niver Tarkis, Elizabeth Hernández, Manuel Larratia y Socorro Ramírez, todos ellos de alguna forma contribuyeron a mi formación, me ayudaron y alentaron en determinado momento, por ello siempre les llevare en mi corazón.

A la Doctora Claudia Patricia Larralde Corona, quien supo ser una amiga, una consejera y una maestra oportuna en todo tiempo, para ella mi gratitud y respeto en donde quiera que me encuentre.

Al Dr. José Alberto Narváez Zapata, quien sin darse cuenta quizás, fue el instrumento que Dios utilizó para moldear mi carácter y ayudarme a ganar en paciencia y sabiduría que viene de lo alto. Gracias Dr. Narváez por su tiempo y por sus enseñanzas , por haberme ayudado a ser una mejor persona el día de hoy, más seguro y confiado en Dios que al momento que inicie a trabajar con su persona.

Mil gracias a todos aquellos que por espacio no mencione acá, que Dios les bendiga eternamente a todos y les ayude a comprender en algún momento lo que nos dice la palabra por medio del proverbista:

***Pro 1:7 El principio de la sabiduría es el temor de Jehová;
Los insensatos desprecian la sabiduría y la enseñanza.***

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de tesis de manera muy especial a mi Dios, por quien vivo y he de vivir el resto de mis días. Aunque los indoctos tuerzan la palabra y decidan no creerle a Dios, yo y mi casa seguiremos al señor, porque un día hace ya más de ocho años me sanó y me liberó de la tumba cuando los sabios de la ciencia dijeron que no podían hacer nada. Dios permita que un día, todos comprendamos lo siguiente:

*Job 28:28 Y dijo al hombre:
He aquí que el temor del Señor es la sabiduría,
Y el apartarse del mal, la inteligencia.*

Al mismo tiempo quiero dedicar esta tesis, después de mi Dios, a mi hermosa familia: Mi amada esposa Patricia Rivas Pérez, una mujer como no hay dos. Ella es el complemento de mi vida, la madre ideal y la fiel compañera de todos mis momentos y quien ha estado ahí siempre para confortarme, escucharme llorar en mis momentos difíciles y hacerme recordar que Dios tiene un plan para cada cosa que nos acontece. A mis adorados bebés: Lizandra Patricia Páramo Rivas, Leandro Marcell Páramo Rivas y Lizaida Pamela Páramo Rivas. Todos ellos han sido mi fuente de inspiración a cada momento y es gracias a sus oraciones ante el señor que he sido fortalecido en todo tiempo.

Al llegar al fin de esta meta, solo pido a Dios que me dé el tiempo suficiente de vida para agradecer todo lo que me ha dado, poder servirle como solo Él lo merece y poder llevar donde quiera que vaya el mensaje de que solo Dios cambia al ser humano, de la arrogancia a la humildad, de la prepotencia a la sabiduría y de la necesidad al entendimiento. Porque todo conocimiento y sabiduría humana son solo necesidades ante Dios. La verdadera sabiduría viene de lo alto según Santiago:

Stg 3:13-17 ¿Quién es sabio y entendido entre vosotros? Muestre por la buena conducta sus obras en sabia mansedumbre. Pero si tenéis celos amargos y contención en vuestro corazón, no os jactéis, ni mintáis contra la verdad; porque esta sabiduría no es la que desciende de lo alto, sino terrenal, animal, diabólica. Porque donde hay celos y contención, allí hay perturbación y toda obra perversa. Pero la sabiduría que es de lo alto es primeramente pura, después pacífica, amable, benigna, llena de misericordia y de buenos frutos, sin incertidumbre ni hipocresía.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
FIGURA 1. VISTA AÉREA (A) Y VISTA FRONTAL DEL CASTILLO CHAPULTEPEC ACTUALIZADAS (B), AL FONDO SE OBSERVA PARTE DE LA CIUDAD (MODIFICADO DE: HTTP://WWW.MEXICOCITY.COM.MX/HISTORIA1.HTML).....	4
FIGURA 2. MONUMENTO A LA MADRE PATRIA (A), DETERIORO OBSERVADO EN EL MONUMENTO (B), BIOPELÍCULAS OBSERVADAS SOBRE LAS ROCAS DE LOS MUROS PERIMETRALES (C) Y BIOMINERALIZACIÓN OBSERVADA SOBRE LAS ROCAS DE LOS MUROS PERIMETRALES DEL CASTILLO DE CHAPULTEPEC (D).	5
FIGURA 3. ASPECTO MICROSCÓPICO DE LA SUPERFICIE DE UNA MUESTRA DE ROCA CALIZA NO TRATADA (A) Y AQUELLAS TRATADAS CON <i>B. SPHAERICUS</i> A CONCENTRACIONES VARIABLES DE UREA Y CLORURO DE CALCIO EN EL MEDIO DE DEPOSICIÓN: 5/12.5 (B), 10/25 (C) Y 20/50 (D). MODIFICADO DE DE MUYNCK <i>ET AL.</i> (2010).	16
FIGURA 4. COMPOSICIÓN DE IMÁGENES DE LA PRECIPITACIÓN DE CaCO_3 (A, TOMADO DE DE MUYNCK <i>ET AL.</i> , 2008B), Y UN EJEMPLO DE UN MONUMENTO ANTES Y DESPUÉS DE RESTAURADO (B, TOMADO DE TIANO <i>ET AL.</i> , 1999.).	16
FIGURA 5. FORMA EN QUE FUE TOMADA Y CONSERVADA LA MUESTRA (A). TAMAÑO DE BIOPELÍCULAS EN COMPARACIÓN AL TAMAÑO DE LA ESPÁTULA (B).	21
FIGURA 6. PROCESO DE LAVADO Y TEÑIDO DE LAS BIOPELÍCULAS. CHAROLAS UTILIZADAS PARA EL PROCESO DE LAVADO DE LAS PLACAS (A), PROCESO DE TEÑIDO CON CRISTAL VIOLETA (B), REPOSO DE LAS MUESTRAS Y (C) EVIDENCIA DE LA FORMACIÓN DE BIOPELICULA SEÑALADAS CON UNA FLECHA.	29
FIGURA 7. PROCESO DE OBTENCIÓN DE CRISTALES: INICIO DEL PROCESO DE COSECHA DE CRISTALES (A), TRANSFERENCIA A ERLNMEYER (B), REPOSO DEL AGAR FUNDIDO Y PRECIPITACIÓN (C), LAVADO DE CRISTALES (D), CRISTALES LISTOS PARA ANÁLISIS POSTERIORES (E).....	32
FIGURA 8. MUESTRAS COLECTADAS: A Y B) BIOPELÍCULAS DEL PUNTO I; C) ZONA BIOMINERALIZADA DEL PUNTO II; D) MONUMENTO DEL PATIO DEL CASTILLO; E) ZONA EROSIONADA DE LA ROCA DEL MONUMENTO Y F). ZONA FRACTURADA Y EROSIONADA DE LA ROCA DEL PUNTO III.....	34
FIGURA 9. MUESTRA REPRESENTATIVA DE LOS DIFERENTES GÉNEROS AISLADOS. AI. <i>TRICHODERMA HARZIANUM</i> , AII. <i>MUCOR HIEMALIS</i> , AIII. <i>FUSARIUM SOLANI</i> , AIV. <i>FUSARIUM SP.</i> , BI. <i>ALTERNARIA TENUISSIMA</i> , BII, <i>ALTERNARIA SP.</i> , BIII. <i>ASPERGILLUS FUMIGATUS</i> , BIV. <i>ASPERGILLUS NIGER</i> , CI. <i>CLADOSPORIUM SP.</i> , CII, <i>PENICILLIUM SP.</i> , CIII. <i>STEMPHYLIUM SP.</i> , CIV. <i>EPICOCUM SP.</i>	39
FIGURA 10. ASPECTO DE LOS HONGOS AISLADOS CON 48 H DE CRECIMIENTO A pH 5.6: AI, BI Y CI. <i>TRICHODERMA HARZIANUM</i> Y ESPORAS DEL MISMO; AII, BII Y CII. <i>FUSARIUM SP</i> Y ESPORAS DEL MISMO; AIII, BIII Y CIII. <i>ALTERNARIA SP</i> Y ESPORAS DEL MISMO; AIV, BIV Y CIV. <i>MUCOR HIEMALIS</i> Y ESPORAS DEL MISMO.	39
FIGURA 11. CULTIVOS DE LEVADURAS PUESTOS A CRECER EN MEDIO RAT Y OBSERVADOS AL MICROSCOPIO A LAS 48 HORAS Y HASTA 8 DÍAS DESPUÉS DE ESTAR EN INCUBACIÓN. LA FLECHA INDICA LA FORMACIÓN DE PSEUDOHIFAS. 41	
FIGURA 12. AISLADOS OBTENIDOS DEL PUNTO III, EN EL CUAL PUEDE OBSERVARSE LA GRAM VARIABILIDAD PRESENTE EN LOS MISMOS. (A) IIS9A <i>BACILLUS CEREUS</i> ; (B, F Y G) IIS5, 31 Y 31 <i>BACILLUS SIMPLEX</i> ; (C) IIS9 <i>ARTHROBACTER SP.</i> ; (D) IIS4 <i>BACILLUS MEGATERIUM</i> ; (E, H) IIS10, IIS9B: <i>BACILLUS SUBTILIS</i> ; (I) BIOPELÍCULA ENCONTRADA EN EL PUNTO III.....	42
FIGURA 13. ADN DE HONGOS FILAMENTOSOS EXTRAÍDOS CON FENOL/CLOROFORMO, CORRIDOS EN GEL DE AGAROSA AL 1.5 % DURANTE 45 MINUTOS A 90 V, CON 3 μL DE CYBER Y 5 μL DE ADN. CARRILES SUPERIORES: 1.III6, 2.III8, 3.I1, 4.II1, 5.II8, 6.T23, 7.I6, 8.III12, 9.I12, 10.I4 Y 11.III4. CARRILES INFERIORES: 1.T31, 2.I16, 3.II3, 4.I3, 5.T15, 6.III1, 7.II6, 8.T17, 9.II2, 10.T24, 11.II2.	44
FIGURA 14. GEL DE AGAROSA AL 1.5% MOSTRANDO EL ADN DE UNA AMPLIFICACIÓN PREVIA (CARRILES SUPERIORES) Y PRODUCTO DE AMPLIFICACIÓN POR PCR (CARRILES INFERIORES) DE LA REGIÓN 26S DEL ADN _R DE LOS HONGOS FILAMENTOSOS. CARRILES SUPERIORES: 1. MM DE 100 BP, 2.I14, 3.I15, 4.III15, 5.T17, 6.T24, 7.T31, I16, 9.I12, 10.T15, 11.TESTIGO+, 12.TESTIGO -. CON 3 mL DE PRODUCTO DE PCR PREVIAMENTE OBTENIDO.	

CARRILES INFERIORES: LA MISMA UBICACIÓN PARA EL MARCADOR MOLECULAR, LOS AISLADOS Y LOS TESTIGOS, SALVO QUE EN ESTE CASO SE TRABAJÓ CON ADN PURO.....	44
FIGURA 15. (A) RESULTADOS DEL ADNG EN GEL DE AGAROSA AL 1.5 % DE LAS LEVADURAS, EXTRAÍDAS CON PROTOCOLO FENOL / CLOROFORMO Y (B) AMPLIFICACIÓN POR PCR CON BSA Y 26S DE LEVADURAS. 1. MM DE 100 BP, 2. CEPA 11, 3. CEPA 15, 4. CEPA 16, 5. CEPA 17, 6. CEPA 18, 7. CEPA 19, 8. TESTIGO -	45
FIGURA 16. <i>REP</i> -PCR Y <i>ERIC</i> -PCR CON BSA DE LOS AISLADOS DE LEVADURAS. LAS CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN SON IGUALES A LAS SEÑALADAS EN LA METODOLOGÍA CON LA EXCEPCIÓN DE QUE LA <i>TM</i> FUE DE 65°C. ABREVIACIONES. A) CARRILES: 1. MM DE 100 BP; 2. CEPA 11; 3. CEPA 15; 4. CEPA 16; 5. CEPA 17; 6. CEPA 18; 7. CEPA 19; 8. TESTIGO POSITIVO; 9. TESTIGO NEGATIVO; 10. MM DE 1 KBP. B) 1 ES MM DE 100 BP, 2: CEPA 15, 3: CEPA 16, 4: CEPA 17, 5: CEPA 18, 6: CEPA 19, 7: TESTIGO +, 8: TESTIGO -, 9: MM DE 1 KBP.....	46
FIGURA 17. GEL DE AGAROSA AL 1.5 %. PARA <i>ERIC</i> -PCR Y <i>REP</i> -PCR DE HONGOS. PANEL A CON INICIADOR <i>ERIC</i> : 1. MM DE 100 BP, 2. II1, 3. II6, 4. III5, 5. II2, 6. III10, 7. I1, 8. III13, 9. III9, 10. T21, 11. III16, 12. III12, 13. TESTIGO POSITIVO, 14. TESTIGO NEGATIVO. PANEL B. LAS MISMAS CEPAS Y MARCADORES DEL CARRIL A PERO CON INICIADOR <i>REP</i>	48
FIGURA 18. (A) GEL DE AGAROSA AL 2% PARA <i>ERIC</i> -PCR DE HONGOS FILAMENTOSOS. (B) GEL DE AGAROSA AL 2 % PARA <i>REP</i> -PCR DE HONGOS FILAMENTOSOS. ABREVIACIONES: A) 1. MM DE 100 BP, 2. III5, 3. III2, 4. III10, 5. I1, 6. II2, 7. T21, 8. T12, 9. I7, 10. I10, 11. III13, 12. III9, 13. I4, 14. MM DE 1 KBP. B) 1. MM DE 100 BP, 2. T12, 3. I9, 4. I13, 5. II4, 6. I10, 7. III2, 8. I6, 9. III7, 10. II4, 11. T21, 12. III3, 13. III4, 14. II3, 15. MM DE 1 KBP.	49
FIGURA 19. COMPOSICIÓN DE GELES MOSTRANDO UN RESUMEN DE LOS RESULTADOS PARA <i>ERIC</i> -PCR (A) Y <i>REP</i> -PCR (B) PARA LOS HONGOS FILAMENTOSOS DE LOS GENEROS <i>FUSARIUM</i> Y <i>CLADOSPORIUM</i> . ABREVIACIONES: PANEL (A) <i>FUSARIUM</i> (1. T12, 2. I7, 3. I10, 4. I9, 5. I2, 6. T11, 7. II4, 8. II1, 9. I13) Y <i>CLADOSPORIUM</i> (10. III3, 11. III5, 12. III2). PANEL B <i>FUSARIUM</i> (1. I2, 2. T12, 3. I9, 4. I13, 5. II4, 6. I10) Y <i>CLADOSPORIUM</i> (7. III2, 8. III3)....	50
FIGURA 20. ÁRBOL FILOGENÉTICO DE AISLADOS DE HONGOS UTILIZANDO EL MÉTODO DE PARES VECINOS Y MÁXIMA PARSIMONIA. LAS RAMIFICACIONES CORRESPONDEN A VALORES DE BOOTSTRAP (ALREDEDOR DE 1000 REPETICIONES). EL OTU <i>FUSARIUM</i> SP. FUE RESUMIDO EN UN GRUPO. LOS NÚMEROS DE ACCESIÓN SON REPRESENTADOS EN PARÉNTESIS. LAS CEPAS QUE CORRESPONDEN A ESTE ESTUDIO APARECEN EN NEGRILLA.	55
FIGURA 21. ALINEACIÓN REPRESENTATIVA DE SECUENCIAS DE CEPAS DE HONGOS MARCADAS COMO OTU DE <i>FUSARIUM</i> SP. EN LA FIGURA 20. LOS NÚMEROS (MOSTRADOS AL FINAL DEL ALINEAMIENTO) CORRESPONDEN A LOS NÚMEROS ORIGINALES DEL NUCLEÓTIDO DE ESE AISLADO. EN LA SECUENCIA ALINEADA, UN PUNTO REPRESENTA LA IDENTIDAD NUCLEOTÍDICA AL DETENERSE LA SECUENCIA CONSENSO (<i>FUSARIUM</i> SP. NÚMERO DE ACCESIÓN EF453171). LOS POLIMORFISMOS EN LAS DIFERENTES SECUENCIAS ESTÁN INDICADOS. LA GRÁFICA GRIS EN LA PARTE INFERIOR DE LA FIGURA MUESTRA LA PARTE CONSERVADA DE LA SECUENCIA DENTRO DE CADA GRUPO ANOTADO.....	55
FIGURA 22. ADN DE BACTERIAS AISLADAS. CARRIL A: 1. 24, 2. 13, 3. IS4, 4. 35, 5. IIS2, 6. IS14, 7. 23, 8. IIS4, 9. IS10, 10. 26, 11. IS13, 12. 28, 13. 27, 14. 21, 15. IIS7, 16. IS3, 17. 32, 18. IS1, 19. IIS15, 20. IIS9. CARRIL B: 1. 12, 2. 33, 3. IS12, 4. 25, 5. IIS8, 6. IIS6, 7. IIS4, 8. IS2, 9. 37, 10. IIS16A, 11. 34, 12. IIS5, 13. IS7, 14. 31, 15. IIS12, 16. IIS16, 17. IIS5, 18. 14, 19. IIS17, 20. 36.....	57
FIGURA 23. PCR 16S (CARRILES A) Y COM (CARRILES B) DE BACTERIAS. CARRILES A: 1. MM DE 100 BP, 2. 1, 3. 3, 4. 5, 5. 7, 6. 8, 7. 9, 8. 10, 9. 11, 10. 12, 11. 17, 12. 18, 13. 19, 14. 25, 15. 26, 16. 27, 17. 29, 18. 30, 19. TESTIGO POSITIVO, 20. TESTIGO NEGATIVO. LOS CARRILES B, SIGUEN LA MISMA DISPOSICIÓN DE LOS CARRILES A PERO EN ESTE CASO ES CON INICIADOR COM.....	58
FIGURA 24. ÁRBOL FILOGENÉTICO DE AISLADOS DE BACTERIAS CORRESPONDIENTE A SECUENCIAS OBTENIDAS CON EL. 63	
FIGURA 25. ÁRBOL FILOGENÉTICO DE AISLADOS DE BACTERIAS CORRESPONDIENTE A SECUENCIAS OBTENIDAS CON EL INICIADOR COM, UTILIZANDO EL MÉTODO DE PARES VECINOS Y MÁXIMA PARSIMONIA. LAS RAMIFICACIONES CORRESPONDEN A VALORES DE BOOTSTRAP (1000 REPETICIONES).	66
FIGURA 26. SECCIÓN DEL ÁRBOL FILOGENÉTICO QUE MUESTRA EL CLADO CON EL AISLADO IS6. (A) SEGÚN EL ÁRBOL FILOGENÉTICO OBTENIDO PARA EL INICIADOR 16 S QUE LO IDENTIFICA COMO <i>BACILLUS SIMPLEX</i> (DQ275175)	

CON 99 % DE HOMOLOGÍA. (B) SEGÚN EL ÁRBOL FILOGENÉTICO OBTENIDO PARA EL INICIADOR COM QUE LO IDENTIFICA COMO <i>PANTOEA AGGLOMERANS</i> (GQ494018) CON UN 99 % HOMOLOGÍA.....	66
FIGURA 27. CRECIMIENTO DE BACTERIAS EN DIFERENTES MOMENTOS DEL PROCESO DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA A 24 HORAS. (A) CRECIDAS EN TUBO, (B) CRECIDAS EN MICRO PLACA Y (C) CEPAS QUE MUESTRAN FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA. LAS FLECHAS INDICAN LOS AISLADOS CON MEJOR FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA.....	67
FIGURA 28. PROCESO DE FORMACIÓN DE LA BIOPELÍCULA EN MICRO PLACA A 48 HORAS DE INCUBACIÓN. (A) RECIÉN RETIRADAS DE INCUBACIÓN. (B) DURANTE EL TEÑIDO CON CRISTAL VIOLETA. (C) CEPAS QUE FORMAN BIOPELÍCULA. LA FLECHA INDICA LOS AISLADOS CON MEJOR FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA.....	68
FIGURA 29. PROCESO DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA. (A Y C) FASE 1 (SIN GLUCOSA). CRECIMIENTO TOTAL (A) Y ADHERIDO (C) FORMANDO BIOPELICULAS A LAS 24 Y 48 H. (B Y D) FASE 2 (CON 0.1% DE GLUCOSA). CRECIMIENTO TOTAL (B) Y ADHERIDO (D) FORMANDO BIOPELICULAS A LAS 24 Y 48 H. LOS DATOS SON RESULTADO DE LA RELACIÓN ENTRE EL CRECIMIENTO INICIAL DE 6.36x10 ⁷ , 42.60x10 ⁷ Y 6.56x10 ⁷ UFC/ML PARA LAS CEPAS IS16 (■), IIS15A (■) Y IIS10 (■) Y SUS CRECIMIENTOS A LAS 24 Y 48H, RESPECTIVAMENTE.	70
FIGURA 30. PROCESO DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA EN FASE 2, PARA LAS CEPAS 1. IS16, 2. IIS15A Y 3. IIS10 A 24 Y 48 HORAS RESPECTIVAMENTE. (A) RECIÉN RETIRADAS DE INCUBACIÓN. (B) DURANTE EL TEÑIDO CON CRISTAL VIOLETA. (C) CEPAS QUE FORMAN BIOPELÍCULA. LA FLECHA MUESTRA LA COLORACIÓN QUE INDICA LA FORMACIÓN DE LA BIOPELÍCULA.....	71
FIGURA 31. CULTIVOS TAL Y COMO FUERON PUESTOS EN AGITACIÓN Y DE LOS CUALES SE TOMABA MUESTRAS EN EL TIEMPO (A) PARA MEDIR SU ABSORBANCIA A LA VEZ QUE SE DISPERSABAN EN PLACAS DE PETRI CON MEDIO AGAR LB POR TRIPLICADO Y SE CONTABILIZABA EL NÚMERO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS, UFC/ML (B)..	73
FIGURA 32. CINÉTICAS DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC/ML) VS TIEMPO (H) PARA LAS CEPAS IS16 (●), IIS15A (●) Y IIS10 (▼) QUE SON LAS QUE MEJORES RESULTADOS REPORTARON EN CUANTO A ESTE PARÁMETRO.....	74
FIGURA 33. CURVAS DE CALIBRACIÓN (UFC/ML) VS ABSORBANCIA PARA LAS CEPAS IS16 (A), IIS15A (B) Y IIS10 (C) OBTENIDAS EN CONDICIONES DE ERLNMEYER CON AGITACIÓN. LOS COEFICIENTES DE CORRELACIÓN (P) SON MOSTRADOS EN LAS ESQUINAS INFERIORES DERECHAS.....	76
FIGURA 34. COMPOSICIÓN FOTOGRAFICA MOSTRANDO LAS DIFERENTES TONALIDADES REESULTANTES DE LA PRUEBA DE UREASA. (A) TUBOS CON MEDIO LB RECIÉN INOCULADOS. (B) A LAS 16 HORAS DE INCUBACIÓN. (C) LOS CULTIVOS QUE A LOS CINCO DÍAS DE INCUBACIÓN YA PRESENTAN ACTIVIDAD DE UREASA.....	77
FIGURA 35. RESULTADOS FINALES DE LA PRUEBA DE UREASA. A. TUBOS CON MEDIO LB RECIÉN INOCULADOS. B. A LOS OCHO DÍAS DE INCUBACIÓN. C. CULTIVOS QUE CRECEN EN EL MEDIO PERO QUE NO MUESTRAN PRESENCIA DE UREASA A LOS OCHO DÍAS DE INCUBACIÓN. D. CULTIVOS QUE NO CRECIERON A LOS 8 DÍAS DE INOCULACIÓN.....	78
FIGURA 36. CRISTALES DE CARBONATO DE CALCIO A LOS 15 Y 22 DÍAS RESPECTIVAMENTE PARA LOS MEJORES FORMADORES DE BIOPELÍCULAS. AI. CONTROL SIN INOCULAR, BI Y CI, CEPA IS16 (<i>BACILLUS SUBTILIS</i>) A LOS 15 Y 22 DÍAS; AII. CONTROL SIN INOCULAR, BII Y CII. CEPA IIS15A (<i>BACILLUS CEREUS</i>) A LOS 15 Y 22 DÍAS; AIII. CONTROL SIN INOCULAR, BIII Y CIII. CEPA IIS10 (<i>BACILLUS SUBTILIS</i>) A LOS 15 Y 22.	79
FIGURA 37. CRISTALES DE CARBONATO DE CALCIO A LOS 15 Y 22 DÍAS RESPECTIVAMENTE PARA LAS CEPAS QUE APORTARON LOS MEJORES RESULTADOS EN BIOPRECIPITACIÓN. AI. CONTROL SIN INOCULAR, BI Y CI. CEPA IIS4 (<i>BACILLUS MEGATERIUM</i>) A LOS 15 Y 22 DÍAS, AII. CONTROL SIN INOCULAR, BII Y CII. CEPA IIS5 (<i>BACILLUS SIMPLEX</i>) A LOS 15 Y 22 DÍAS, AIII. CONTROL SIN INOCULAR, BIII Y CIII. CEPA IIS9B (<i>BACILLUS SUBTILIS</i>) A LOS 15 Y 22 DÍAS.	80
FIGURA 38. CRISTALES DE CARBONATO DE CALCIO A LOS 15 Y 22 DÍAS RESPECTIVAMENTE PARA LAS CEPAS QUE APORTARON LOS MEJORES RESULTADOS EN BIOPRECIPITACIÓN. AI. CONTROL SIN INOCULAR, AII Y AIII. CEPA IS5 (<i>BACILLUS SUBTILIS</i>) A LOS 15 Y 22 DÍAS; BI. CONTROL SIN INOCULAR, BII Y BIII. CEPA 21 (<i>PANTOEA AGGLOMERANS</i>) A LOS 15 Y 22 DÍAS.....	81
FIGURA 39. MICROGRAFIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (ESM) DE CRISTALES OBTENIDOS A PARTIR DE BACTERIAS CON ALTOS POTENCIALS BIOTECNOLÓGICOS. (A Y E) <i>BACILLUS SUBTILIS</i> LBI28, (B Y F) <i>BACILLUS SUBTILIS</i> LBI15, (C Y G) <i>BACILLUS SUBTILIS</i> LBI35, Y (D Y H) <i>PANTOEA AGGLOMERANS</i> LBIR. COMPOSICIÓN IZQUIERDA: MORFOLOGÍA	

COMPARATIVA DE CRISTALES (ESCALA A 50 μ M). COMPOSICIÓN DERECHA: DETALLES DE CRISTALES CILÍNDRICOS Y ROMBOHEDRICOS (E), CÉLULAS BACTERIANAS SOBRE CRISTALS ROMBOHEDRICOS (F), DETALLES DE CRISTALES CILINDRIOS Y ROMBOHEDRICOS (G), DETALLES DE CRISTALES ROMBOHEDRICOS (H).....	82
FIGURA 40. ESPECTROGRAMA PARA LAS CEPAS 31, IIS5 (MUESTRAS 1 Y 2; <i>BACILLUS SIMPLEX</i>), Y IS5 (MUESTRA 3, <i>BACILLUS SUBTILIS</i>).....	83
FIGURA 41. ESPECTROGRAMA PARA LAS CEPAS IS16, IS3, IS4 (MUESTRAS 7, 9, Y 10; <i>BACILLUS SUBTILIS</i>) Y IIS2 (MUESTRA 8, <i>BACILLUS CEREUS</i>).....	84
FIGURA 42. HONGOS FILAMENTOSOS PERTENECIENTES A LOS GÉNEROS <i>MUCOR</i> , <i>TRICHODERMA</i> Y <i>CLADOSPORIUM</i> . AI-A3. <i>MUCOR HIEMALIS</i> , BI. <i>TRICHODERMA VIRIDE</i> , BII. <i>TRICHODERMA HARZIANUM</i> , B.III. <i>TRICHODERMA ATROVIRIDE</i> , CI-CIII. <i>CLADOSPORIUM SP.</i>	143
FIGURA 43. HONGOS FILAMENTOSOS PERTENECIENTES AL GÉNERO <i>FUSARIUM</i> . AI-A3. <i>FUSARIUM SP.</i> , BI-BIII. <i>FUSARIUM SP.</i> , CI-CIII. <i>FUSARIUM SP.</i>	143
FIGURA 44. HONGOS FILAMENTOSOS PERTENECIENTES A LOS GÉNEROS <i>ALTERNARIA</i> , <i>ASPERGILLUS</i> Y <i>STEMPHYLIUM</i> . AI. <i>ALTERNARIA TENUISSIMA</i> , AII. <i>ALTERNARIA SP.</i> , AIII. <i>ASPERGILLUS FUMIGATUS</i> , BI. <i>ASPERGILLUS NIGER</i> , BII-B.III. <i>STEMPHYLIUM SP.</i> , CI-CIII. <i>STEMPHYLIUM SP.</i>	144
FIGURA 45. HONGOS FILAMENTOSOS PERTENECIENTES A LOS GÉNEROS <i>FUSARIUM</i> , <i>PENICILLIUM</i> , <i>EPICOCCUM</i> , <i>PESTALOTIOPSIS</i> , <i>PHOMOPSIS</i> , <i>STREPTOMICETO</i> Y <i>HELICOSPORIUM</i> . AI. <i>FUSARIUM SP.</i> , AII. <i>FUSARIUM SOLANI</i> , AIII. <i>PENICILLIUM SP.</i> , BI. <i>EPICOCCUM SP.</i> , BII. <i>PESTALOTIOPSIS SP.</i> , B.III. <i>PHOMOPSIS SP.</i> , CI Y CII. <i>STREPTOMICETO SP.</i> , CIII. <i>HELISOSPORIUM SP.</i>	144
FIGURA 46. HONGOS CRECIDOS A PH 5.6, 48 Y 72 HORAS DE INCUBACIÓN. AI, BI. <i>TRICHODERMA HARZIANUM</i> , AII, BII. <i>FUSARIUM SP.</i> , AIII, BIII. <i>ALTERNARIA SP.</i> , AIV, BIV. <i>MUCOR HIEMALIS</i> (48 Y 72 HORAS). ESPORAS (D). DI. <i>TRICHODERMA HARZIANUM</i> (72), DII. <i>FUSARIUM SP.</i> (120), DIII. <i>ALTERNARIA SP.</i> (160), DIV. <i>MUCOR HIEMALIS</i> (96). CI-EI. <i>TRICHODERMA HARZIANUM</i> , CII-EII. <i>FUSARIUM SP.</i> , CIII-EIII. <i>ALTERNARIA SP.</i> , CIV-EIV. <i>MUCOR HIEMALIS</i> (96 HORAS) (REVERSO Y FRENTE DE LA PLACA PARA TODOS).....	145
FIGURA 47. HONGOS CRECIDOS A PH 5.6, 48 Y 72 HORAS DE INCUBACIÓN AI, BI. <i>CLADOSPORIUM SP.</i> , AII, BII. <i>FUSARIUM SP.</i> , AIII, BIII. <i>ALTERNARIA TENUISSIMA</i> , AIV, BIV. <i>PHOMAS EXIGUA</i> (48 Y 72 HORAS). ESPORAS (D). DI. <i>CLADOSPORIUM SP.</i> (120), DII. <i>FUSARIUM SP.</i> (144), DIII. <i>ALTERNARIA TENUISSIMA</i> (96), DIV. <i>PHOMA EXIGUA</i> (240). CI-EI. <i>CLADOSPORIUM SP.</i> , CII-EII. <i>FUSARIUM SP.</i> , CIII-EIII. <i>ALTERNARIA TENUISSIMA</i> , CIV-EIV. <i>PHOMA EXIGUA</i> (96 HORAS) (REVERSO Y FRENTE DE LA PLACA).....	146
FIGURA 48. PRUEBA GRAM PARA LOS AISLADOS CORRESPONDIENTES AL PUNTO I.A, E, F, I. IS4, IS5, IS16, IS3. <i>BACILLUS SUBTILIS</i> ; B. IS12 <i>BACILLUS CEREUS</i> ; C. IS6 <i>PANTOEA AGGLOMERANS</i> ; D, G, H. IS1, IS17, IS17A. <i>PSEUDOMONA SP.</i> ; J. IS8 <i>BACILLUS PUMILUS</i> ; K. IS2 <i>ARTHROBACTER SP.</i> Y L. BIOPELICULA LOCALIZADA EN EL PUNTO I.....	147
FIGURA 49. PRUEBA GRAM PARA LOS AISLADOS CORRESPONDIENTES AL PUNTO II.A, E. IIS17, IIS15A. <i>BACILLUS CEREUS</i> ; B, F, I. IIS10, IIS9, IIS2. <i>BACILLUS PUMILUS</i> ; C, G. IIS3, IIS12. <i>BACILLUS SIMPLEX</i> ; D. 27 <i>STENOTROPHOMONAS SP.</i> ; H. <i>BACILLUS PSYCHRODURANS</i> ; J, K. IIS4, 21. <i>PANTOEA AGGLOMERANS</i> Y L. BIOPELICULA CON SIGNOS DE BIOMINERALIZACION ENCONTRADA EN EL PUNTO II.....	147
FIGURA 50. CRISTALES DE CARBONATO DE CALCIO A LOS 3,5 Y 7 DÍAS RESPECTIVAMENTE PARA LAS CEPAS QUE APORTARON LOS MEJORES RESULTADOS EN FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS. AI.CONTROL SIN INOCULAR, BI, CI Y DI.CEPA IS16 (<i>BACILLUS SUBTILIS</i>) A LOS 3, 5 Y 7 DÍAS. AII. CONTROL SIN INOCULAR, BII, CII Y DII. CEPA IIS15A (<i>BACILLUS CEREUS</i>) A LOS 3, 5 Y 7 DÍAS. AIII. CONTROL SIN INOCULAR, BIII, CIII Y DIII CEPA IIS10 (<i>BACILLUS SUBTILIS</i>) A LOS 3, 5 Y 7 DÍAS.....	148
FIGURA 51. CRISTALES DE CARBONATO DE CALCIO A LOS 3, 5 Y 7 DÍAS RESPECTIVAMENTE PARA LAS CEPAS QUE APORTARON LOS MEJORES RESULTADOS EN BIOPRECIPITACIÓN. AI.CONTROL SIN INOCULAR, BI, CI Y DI.CEPA IIS4 (<i>BACILLUS MEGATERIUM</i>) A LOS 3, 5 Y 7 DÍAS. AII. CONTROL SIN INOCULAR, BII, CII Y DII. CEPA IIS5 (<i>BACILLUS SIMPLEX</i>) A LOS 3, 5 Y 7 DÍAS. AIII. CONTROL SIN INOCULAR, BIII, CIII Y DIII. CEPA IIS9B (<i>BACILLUS SUBTILIS</i>) A LOS 3, 5 Y 7 DÍAS.....	149

FIGURA 52. CRISTALES DE CARBONATO DE CALCIO A LOS 3, 5 Y 7 DÍAS RESPECTIVAMENTE PARA LAS CEPAS QUE APORTARON LOS MEJORES RESULTADOS EN BIOPRECIPITACIÓN. AI.CONTROL SIN INOCULAR, AII-AIV. CEPA IS5 (*BACILLUS SUBTILIS*) A LOS 3, 5 Y 7 DÍAS. BI. CONTROL SIN INOCULAR, BII-BIV. CEPA 21 (*PANTOEA AGGLOMERANS*) A LOS 3, 5 Y 7 DÍAS..... 150

LISTA DE CUADROS

CUADRO	PÁGINA
CUADRO 1. CONDICIONES DE SECUENCIACIÓN (A) Y DEL TERMOCICLADOR PARA HONGOS FILAMENTOSOS (B).....	26
CUADRO 2. AISLADOS UTILIZADOS PARA ENSAYAR LOS PROCESOS DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS Y BIOPRECIPITACIÓN DE CRISTALES DE CARBONATO DE CALCIO.....	27
CUADRO 3. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LOS AISLADOS DE HONGOS FILAMENTOSOS IDENTIFICADOS	35
CUADRO 4. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA LAS LEVADURAS AISLADAS.....	40
CUADRO 5. CONDICIONES DE REACCIÓN FINALES, PARA EL DESARROLLO DE LAS <i>REP</i> -PCR Y <i>ERIC</i> -PCR DE HONGOS FILAMENTOSOS.....	47
CUADRO 6. COMPARACIÓN DE LA IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS Y LEVADURAS, MEDIANTE INFORMACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS MISMOS CON INFORMACIÓN DE LAS SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS PARA CADA MICROORGANISMO.....	51
CUADRO 7. IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS AISLADAS MEDIANTE SECUENCIACIÓN, UTILIZANDO LOS INICIADORES COM Y 16 S.	60
CUADRO 8. VALORES DE ABSORBANCIA ($A_{540\text{nm}}$) EN MICROPLACA PARA CADA UNA DE LOS SEIS MEJORES AISLADOS EN CUANTO A FORMAR BIOPELÍCULAS A LAS 24 HORAS DE INCUBACIÓN DE UN TOTAL DE 30 AISLADOS DE ESTUDIO. .	67
CUADRO 9. VALORES DE ABSORBANCIAS PROMEDIOS Y SUS CORRESPONDIENTES DESVIACIONES ESTÁNDAR, DURANTE TODO EL PROCESO DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA, DESDE EL CRECIMIENTO EN TUBO, PASANDO POR MICROPLACA HASTA EL BIOFILM A 24 Y 48 HORAS RESPECTIVAMENTE PARA LA FASE 1 (SIN GLUCOSA) Y 2 (CON 0.1% DE GLUCOSA).....	69
CUADRO 10. VALORES DE ABSORBANCIA LEÍDOS EN EL TIEMPO (H) DURANTE 24 HORAS PARA CADA UNA DE LAS CEPAS EN ESTUDIO (IS16, IIS15A Y IIS10).....	73
CUADRO 11. VALORES DE ABSORBANCIAS A 540 NM Y VALORES DE UFC/ML A PARTIR DE LOS CUALES SE CONSTRUYEN LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN.	75
CUADRO 12. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS Y DE FORMACIÓN DE CRISTALES DE LOS AISLAMIENTOS FORMADORES DE BIOPELICULAS A LAS 24 Y 48 HORAS EN MICROPLACAS.....	85
CUADRO 13. DIVERSIDAD BACTERIANA AISLADA Y SU RELACIÓN CON EL BIODETERIORO DOCUMENTADO HASTA EL MOMENTO.	88
CUADRO 14. DIVERSIDAD FÚNGICA AISLADA Y SU RELACIÓN CON EL BIODETERIORO DOCUMENTADO HASTA EL MOMENTO.	88
CUADRO 15. DIVERSIDAD BACTERIANA AISLADA Y SU RELACIÓN CON SU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DOCUMENTADO HASTA EL MOMENTO	89
CUADRO 16. DIVERSIDAD FÚNGICA AISLADA Y SU RELACIÓN CON SU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DOCUMENTADO HASTA EL MOMENTO.	90
CUADRO 17. SECUENCIAS OBTENIDAS PARA CADA UNO DE LOS AISLADOS CON SU CÓDIGO INTERNO PARA EL LABORATORIO, EL NOMBRE CON EL QUE FINALMENTE SE IDENTIFICÓ Y SU CORRESPONDIENTE ACCESIÓN AL GENBANK.....	140

RESUMEN

El deterioro de las rocas de edificios y del patrimonio cultural ha llevado a la investigación y desarrollo de novedosos tratamientos de consolidación y/o protección que puedan superar las limitaciones de los tradicionales. Especial atención ha sido puesta a la bioconservación, particularmente a la carbonatogénesis bacteriana (por ejemplo, la precipitación de carbonatos de calcio inducida por las bacterias), como una estrategia de conservación ambientalmente amigable y efectiva. La biopelícula también es un microambiente donde la precipitación puede ser facilitada o inhibida alrededor de escalas microscópicas y exhibir alguna organización espacial.

En el presente trabajo se caracterizaron las biopelículas existentes sobre superficies asociadas al exterior del Castillo de Chapultepec (cimientos perimetrales y monumentos externos) en la Ciudad de México. Esta caracterización involucró la determinación de los grupos de microorganismos existentes (fracción cultivable), así como su potencial aplicación para la preservación de la infraestructura y detoxificación de los compuestos contaminantes ambientales. Se logró aislar una gran variedad de microorganismos entre los que se encuentran hongos filamentosos (alrededor de 48 aislados) que han sido identificados y que pertenecen a los géneros *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Alternaria*, *Mucor*, *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium*, entre otros. Algunos de estos géneros han sido reportados como responsables del deterioro del patrimonio cultural por diversos autores y mediante mecanismos variados. También se ha logrado la identificación de 6 levaduras pertenecientes a los géneros *Rhodotorula* y el hongo dimórfico *Aureobasidium*, esta último ha sido mencionada como participante en el deterioro del patrimonio cultural mediante la producción de diversos pigmentos que dan aspecto antiestético a los diferentes monumentos en los que se desarrollan. También se obtuvieron 70 aislamientos bacterianos entre las que se han identificado mayormente *Bacillus*, *Arthobacter*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Curtobacterium*, *Kokuria*, *Microbacterium* y *Brevundimonas*, entre otras. Los resultados obtenidos mediante el desarrollo de este trabajo muestran que en alguna medida todos los microorganismos probados (de un grupo inicial de 30 aislados bacterianos) participan en el proceso de formación de biopelículas, aunque finalmente un total de 12 aislados destacaron dentro de este grupo como los mejores formadores de biopelículas, sobresaliendo las cepas IS16, IIS10 (*Bacillus subtilis*) y IIS15a (*Bacillus cereus*) por ser las que mayores cuentas bacterianas (UFC/mL) presentaron en la biopelícula. Finalmente, los 12 aislados que fueron buenos formadores de biopelículas resultan también adecuados en cuanto a su bioprecipitación de carbonatos, destacando las cepas IIS4 (*Bacillus megaterium*), IS5 e IIS9b (*Bacillus subtilis*), 21 (*Pantoea agglomerans*) y la IIS5 (*Bacillus simplex*), las cuales formaron cristales de diferente tamaño, morfología y colores en un tiempo de 15 días de incubación.

En correspondencia con la literatura revisada, se puede concluir que muchos de los aislados de hongos filamentosos, levaduras y bacterias obtenidos de las biopelículas epilíticas muestreadas en los alrededores del Castillo de Chapultepec participan en procesos de

biodeterioro por medio de diversos mecanismos. Al mismo tiempo, algunos de estos microorganismos podrían ser utilizados por su capacidad de producción de ureasa, involucrada en la precipitación inducida de calcita que contribuya a la restauración de dichos monumentos, con solo la adición del medio que contenga la urea y el calcio en las concentraciones idóneas para ello. Existe suficiente evidencia reportada en la literatura como para considerar que entre los aislados obtenidos, se cuenta con un buen número de cepas de microorganismos que pudiesen ser de gran interés para el desarrollo de diversos procesos biotecnológicos como son: *Aureobasidium pullulans*, varias especies de *Trichodermas* y *Bacillus subtilis* por mencionar algunos de los aislados obtenidos y cuyo estudio posterior podría generar nuevos procesos biotecnológicos de gran valor.

ABSTRACT

The deterioration of the building rocks and of the cultural heritage has led to the research and development of new treatments of consolidation and / or protection that could overcome the limitations of the traditional ones. Special attention has been put to the bioconservation, particularly to the bacterial carbonatogenesis (for example, bacterially induced carbonate precipitation of calcium), as a strategy of conservation environmental friendly and effective. The biofilm is also microenvironments where precipitation can be facilitated or inhibited about microscopic scales and exhibit some class of spatial organization. This study aims to characterize the existing biofilms on outer surfaces associated of the Castillo de Chapultepec (exterior walls and monuments) in Mexico City. It involves the grouping of existing microorganisms (cultivable fraction) present in the biofilms and the exploration of these microorganisms for potential application in the preservation of infrastructure and detoxification of environmental pollutants compounds. As a result, has been isolated a collection of microorganisms including filamentous fungi (around 48 isolates) which have been identified and belong to the genera *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Alternaria*, *Mucor*, *Fusarium*, *Aspergillus* and *Penicillium*, among others. Some of these genera have been reported to be responsible for deterioration of cultural heritage through a variety of mechanisms. Also, 6 yeast belonging to the genera *Rhodotorula* and the dimorphic fungi *Aureobasidium* has been isolated and identified, the latter has been mentioned a participant in the deterioration of cultural heritage through the production of several pigments that were unsightly to the various monuments. Finally about 70 isolates of bacteria, have been identified mostly as *Bacillus*, *Arthobacter*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Curtobacterium*, *Kokuria*, *Microbacterium*, and *Brevundimonas*, among others. The results obtained from this work show that all microorganisms tested (from a group of 30 bacterial isolates) were involved in the process of biofilm formation, of which, only 12 isolates, including the IS16 (*Bacillus subtilis*); IIS15a (*Bacillus cereus*) and IIS10 (*Bacillus subtilis*) strains, were the best biofilms formers with high UFC / mL counts in the assay and were also good in terms of bioprecipitation carbonate. Particularly, the strains IIS4 (*Bacillus megaterium*), IS5 (*Bacillus subtilis*), IIS9b (*Bacillus subtilis*), 21 (*Pantoea agglomerans*) and IIS5 (*Bacillus simplex*) formed different crystals in size, morphology and colors in 15 days of the incubation process.

It can be concluded from literatures that many isolates of filamentous fungi, yeasts and bacteria obtained from these epilithic biofilms have been mentioned as participants in the processes of biodeterioration through of different mechanisms. Some of the microorganisms could be capable of producing urease, to induce precipitation of calcite that contributes to the restoration of these monuments by the addition to media that contains urea and calcium concentrations. There is evidence reported in the literatures to mention that a number of strains of microorganisms could be of interest to the development of several biotechnological processes such as: *Aureobasidium pullulans*, several species of *Trichoderma* and *Bacillus subtilis*. A few the isolates obtained in this research are needed to do further study that could lead to new biotechnological processes of great value.

1. INTRODUCCIÓN

El desgaste de los edificios es un problema generalizado que encontramos en muchas partes alrededor del mundo, ya sean hechos estos edificios de concreto así como edificios históricos hechos de rocas o ladrillos (Anne *et al.*, 2010). Esos materiales porosos están sujetos al deterioro debido a la acción de agentes ambientales externos (físicos, químicos y biológicos) (Gaspar y De Brito, 2008). En la última década, el tema de la colonización microbiana y el biodeterioro de murales pintados en monumentos antiguos o de paredes de yeso en iglesias ha atraído la atención de microbiólogos y conservadores (Laiz *et al.*, 2009). Muchos fenómenos pueden ser observados, los más comúnmente reportados incluyen formación de fluorescencia, desgaste, cambios de coloración con formaciones antiestéticas, sobre crecimiento de biopelículas fotosintéticas verdes, etc (Laiz *et al.*, 2009). Este biodeterioro es especialmente importante cuando los edificios son de interés histórico y cultural (Ortega-Morales *et al.*, 1999; Ortega-Morales *et al.*, 2000; Ortega-Morales *et al.*, 2001). Las comunidades microbianas colonizan diferentes zonas de las rocas, creciendo como epilíticas sobre la superficie y como comunidades endolíticas (chasmoendolíticas y criptoendolíticas) dentro de fracturas y poros de los sustratos (Golubic *et al.*, 1981). Videla *et al.*, (2003), sugieren que los mecanismos de biodeterioro se deben, predominantemente, a procesos de biosolubilización; estos procesos involucran la producción de metabolitos ácidos provenientes de la actividad bacteriana y fúngica que pueden potenciar los efectos agresivos de la corrosión atmosférica.

El término biopelícula (*biofilm*) hace referencia a una serie de microorganismos que se encuentran agregados en un exopolímero compuesto de glicocálix (75%) y que se organizan en forma de colonias adheridas a diferentes superficies, ya sean blandas, animadas e inanimadas (Costerton, 1999). La importancia de las biopelículas se comenzó a estudiar desde mediados de la década de 1970, cuando se hablaba de los efectos en los diversos ambientes naturales de estas organizaciones no muy bien comprendidas. Dos décadas después con el desarrollo de técnicas microscópicas más avanzadas que permitieron entender la ultra estructura y dinámica de estas asociaciones, se pudo constatar este hecho y se comenzaron a involucrar en múltiples y distintos eventos que tienen impacto sobre el bienestar del hombre y su entorno (McCarthy, 2001; Betancourth *et al.*, 2004). Una de las características de las biopelículas es la heterogeneidad, lo que las hace organizaciones únicas que pueden estar conformadas por bacterias, hongos y protozoos. Se ha visto entonces, que los microorganismos al ser variados dentro de esta organización presentan diferentes microambientes de pH, tensión de oxígeno, concentración de iones, carbono y nitrógeno (Costerton *et al.*, 1994; Vroom *et al.*, 1999). En las últimas décadas, una amplia gama de sistemas modelos han sido descritos para el estudio *in vitro* de formación y desarrollo de biopelículas (McLean *et al.*, 2004). En muchos de esos sistemas modelos, la cuantificación de la biomasa de la biopelícula es hecha por plaqueo convencional, lo cual es una labor intensiva y lenta (Donlan y Costerton, 2002). En los últimos años, diversos ensayos para la cuantificación de la biopelícula en micro platos han sido descritos. Esos pueden ser

clasificados dentro de los ensayos de cuantificación de biomasa en biopelículas (basados en la cuantificación de la matriz celular, tanto células vivas como muertas), ensayos de viabilidad (basados en la cuantificación de células viables) y ensayos de cuantificación de la matriz celular (basado en el teñido específico de componentes de la matriz) (Peeters *et al.*, 2008). El método de teñido con cristal violeta (CV) fue desarrollado primeramente por Christensen *et al.*, (1985) y desde entonces ha sido modificado para incrementar su confiabilidad y para permitir la cuantificación de la biomasa de la biopelícula de forma completa (Stepanovic *et al.*, 2000). CV es un colorante básico, el cual se liga a moléculas superficiales cargadas negativamente y a polisacáridos de la matriz extracelular (Li *et al.*, 2003). Debido a que las células (tanto vivas como muertas), así como componentes de la matriz celular son teñidos por medio del CV, este no es el más adecuado para evaluar células vivas en la biopelícula (Pitts *et al.*, 2003).

Uno de los usos potenciales de las Biopelículas es la biomineralización, este fenómeno es definido como una precipitación biológicamente inducida en la cual un microorganismo crea un microambiente local, con condiciones que permiten la precipitación química extracelular de la fase mineral (Hamilton, 2003). Especies del grupo *Bacillus* son capaces de precipitar calcio en sus constituyentes celulares y en sus microambientes por conversión de urea en amonio y dióxido de carbono (Castanier *et al.*, 1999; Hammes *et al.*, 2003). La degradación bacteriana de la urea incrementa localmente el pH y promueve la deposición microbiana del dióxido de carbono como carbonato de calcio en un ambiente rico en calcio (Warren *et al.*, 2001). Dick *et al.*, (2006), demostraron que diversos factores están involucrados en la conservación y remediación de la roca caliza deteriorada, habiendo investigado los procesos de precipitación ureolítica de calcio. Mediante su investigación, se observó que cepas de *B. sphearicus* con un fuerte [-] potencial negativo, una alta degradación inicial de urea y una continua formación de cristales densos de carbonato de calcio, resultaron ser mejores para producir una capa continua de carbonato de calcio sobre la roca caliza degradada. Estas cepas (*B. sphearicus*) también disminuyeron significativamente la absorción capilar de agua de la roca caliza tratada según demostraron los resultados obtenidos por Dick *et al.*, (2006). Jiménez-López *et al.*, (2007); demostraron que una roca deteriorada por efectos microbiológicos puede ser restaurada utilizando un método amistoso para el ambiente, como lo es la aplicación *in situ* de un medio de cultivo estéril, que es capaz de activar una vez dentro de la comunidad microbiana de la roca, a aquellas bacterias con un potencial para la precipitación de carbonato de calcio. Como una consecuencia del crecimiento de esas bacterias, ocurre una alcalinización que resulta en precipitación de carbonato de calcio. La nueva capa de calcio depositada restaura la roca sin poros abiertos. De Muynck *et al.*, (2008 a, b) reportaron los efectos sobre la durabilidad de materiales de cemento que tiene la capa de carbonato de calcio que es depositada por las bacterias (biodeposition) debido fundamentalmente a la disminución de la absorción de agua y a un incremento de la resistencia a los cambios bruscos de temperatura que experimentan los materiales expuestos a la biodeposición bacteriana de calcio.

El presente trabajo pretende caracterizar las biopelículas existentes sobre superficies exteriores y en los alrededores del Castillo de Chapultepec (los cimientos y monumentos

externos) en la Ciudad de México. Esta caracterización involucra la determinación de los grupos de microorganismos existentes (cultivables), así como su potencial aplicación para el desarrollo de futuros procesos biotecnológicos y para la preservación de la infraestructura y detoxificación de los compuestos contaminantes ambientales.

2 ANTECEDENTES

2.1 Zona de estudio, Castillo de Chapultepec

Al interior de la cuenca de México destaca, al Poniente, un pequeño cerro cuya elevación es de 23° sobre la Plaza Mayor de la Ciudad de México. La disponibilidad de recursos naturales y su posición estratégica lo hicieron atractivo para diferentes grupos prehispánicos como los Teotihuacanos, Toltecas y Tepanecas. Aproximadamente en la mitad del siglo 12 se establecieron los Mexicas otorgándole su nombre actual y habitándolo hasta 1280 cuando fue fundada Tenochtitlán (fuente: <http://www.mexicocity.com.mx/historia1.html>).



Figura 1. Vista aérea (A) y Vista frontal del Castillo Chapultepec actualizadas (B), al fondo se observa parte de la ciudad (Modificado de: <http://www.mexicocity.com.mx/historia1.html>)

El Castillo presentó su mayor esplendor (Figura 1) durante el porfiriato. El Castillo y el cerro de Chapultepec también fueron esenarios de la heroica defensa contra la intervención Norteamericana en 1847. Posteriormente, durante la intervención francesa y la autoridad de Maximiliano de Habsburgo como emperador del país, el castillo fue utilizado como residencia imperial (<http://www.explorandomexico.com.mx/about-mexico/4/184/>). Durante este periodo se llevaron a cabo obras de embellecimiento, tanto en el castillo como del bosque mismo. Más tarde, durante el gobierno de Porfirio Díaz, fue reedificado con su actual fisonomía. Posteriormente se usó como residencia de los presidentes de la República, entre los que pueden mencionarse a Francisco I. Madero, Venustiano Carranza, Pascual Ortiz Rubio y Abelardo Rodríguez, algunos de los cuales ordenaron hacerle ciertas modificaciones.

Finalmente en 1940, siendo presidente el general Lázaro Cárdenas, el castillo fue cedido para ser convertido en Museo Nacional de Historia, el cual se inauguró en septiembre de 1944. Este museo se formó con objetos que tenía el antiguo museo de Arqueología, Historia y Etnografía, además de otros provenientes del museo de Artillería, del Convento de San Francisco, del antiguo ayuntamiento de compras y con diversas donaciones. De entonces a la fecha tanto su acervo como la forma de representar el material han sufrido varias

transformaciones y sus colecciones han aumentado, por lo que el lugar se ha restaurado para hacer una mejor presentación de su contenido, el cual se divide de la siguiente manera: en la planta baja las salas de la conquista, la conquista religiosa, el comercio con oriente, el desarrollo urbano de la Ciudad de México, la galería de virreyes, la independencia, el México independiente, del presidente Juárez, la revolución, los carruajes, la galería de banderas, la antesala de acuerdos de secretarios de estado, la sala de acuerdo de los presidentes de la república, el salón chino, el cuarto de baño y la recámara de la emperatriz Carlota, el salón de té y la sala de recepción de los emperadores (<http://www.mexicocity.com.mx/historia1.html>).

En la actualidad el Castillo de Chapultepec está siendo sometido a una serie de trabajos tendientes a su remodelación y como producto del paso del tiempo, de la acción de los elementos climáticos, de la contaminación ambiental y de la acción de los microorganismos; es normal apreciar el deterioro que los aspectos antes mencionados han provocado sobre la infraestructura de este preciado monumento nacional de México. En las Figuras 2 A-D, se puede observar el deterioro y las biopelículas presentes en el lugar.

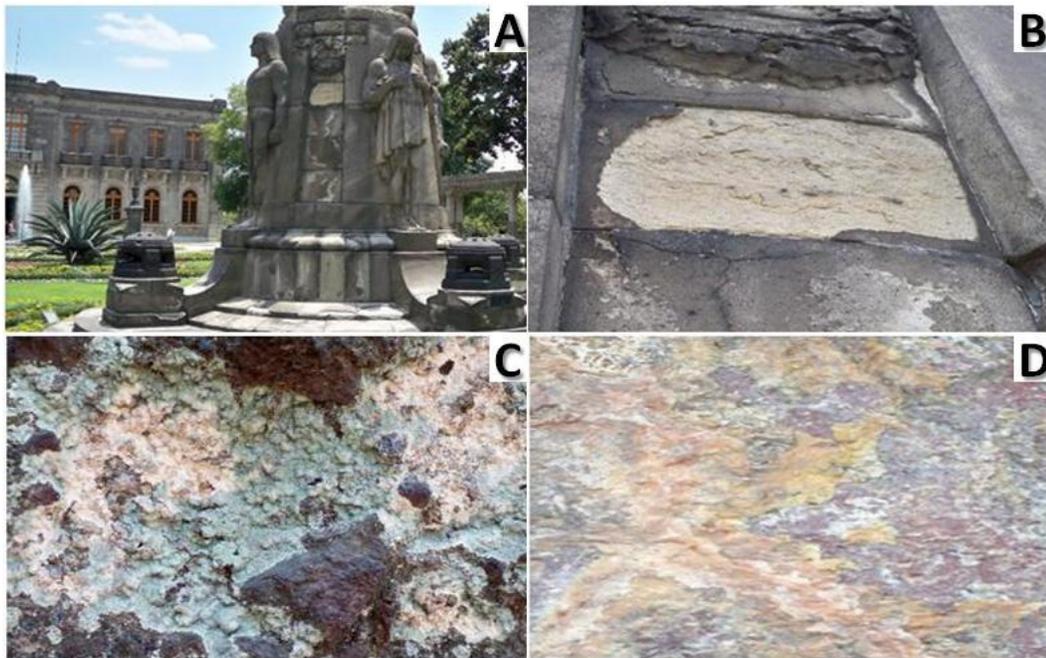


Figura 2. Monumento a la Madre Patria (A), Deterioro observado en el monumento (B), Biopelículas observadas sobre las rocas de los muros perimetrales (C) y Biomineralización observada sobre las rocas de los muros perimetrales del Castillo de Chapultepec (D).

Si se considera el valor histórico y cultural del Castillo de Chapultepec y sus alrededores para el patrimonio de México (http://www.difusioncultural.unam.mx/index2.php?option=com_content), cualquier esfuerzo en aras de preservar este edificio y sus alrededores vale la pena. Así mismo, cualquier trabajo que se emprenda en aras de restaurar este tipo de monumentos y evitar su deterioro podría estar justificado. De aquí la importancia que reviste el desarrollo de este estudio, ya que hasta la fecha no ha sido reportado ningún trabajo que determine agentes causales del deterioro mostrado en superficies o sustratos rocosos de esta área y que a su vez proponga medidas para su restauración científicamente demostrada.

2.2 Generalidades sobre las biopelículas microbianas

El término biopelícula (*biofilm*) hace referencia a una serie de microorganismos que se encuentran agregados en un exopolímero compuesto de glicocálix (75%) y que se organizan en forma de colonias adheridas a diferentes superficies, ya sean blandas, animadas e inanimadas (Costerton, 1999). Muchos intentos se han realizado para caracterizar comunidades microbianas de diferentes procedencias, la mayoría de estos intentos han sido basados en el cultivo (Delille, 1995; Jørgensen y Bak, 1991; Parkes *et al.*, 1994) y por tanto han estado sujetos a limitaciones que han conducido a resultados parciales de lo que realmente es la composición de la comunidad microbiana de estos sitios (Amann *et al.*, 1995). Las técnicas moleculares han incrementado grandemente nuestros conocimientos sobre la diversidad microbiana en diferentes ambientes, por ejemplo en los sedimentos marinos y en el plankton, debido a que bibliotecas basadas en el gen 16S rADN han sugerido la presencia de organismos hasta ahora no cultivables (DeLong *et al.*, 1993; DeLong *et al.*, 1994; González y Morán, 1997; Gray y Herwig, 1996). Técnicas tales como el análisis de la re-asociación de ADN (Torsvik *et al.*, 1996), gel electroforético en gradiente desnaturizante (DGGE) (Teske *et al.*, 1996) y la de fragmentos de restricción de regiones polimórficas (RFLP) (Moyer *et al.*, 1994) han permitido profundizar sobre la composición y la diversidad de la comunidad microbiana.

Las comunidades microbianas que se desarrollan asociadas a los sustratos de roca son en parte responsables del deterioro químico y físico de la misma y alteran a través de diferentes mecanismos la apariencia estética y la integridad física del material (Krumbein, 1988) con la consecuente formación de suciedad y transformación de minerales (Eckardt, 1985). La excreción de enzimas y ácidos inorgánicos y orgánicos disuelve los componentes estructurales del sustrato mineral, contribuyendo a los procesos de deterioro (Warscheid *et al.*, 1988). El biodeterioro de la propiedad cultural es el daño físico o químico efectuado por diferentes tipos de organismos en objetos, monumentos o edificios que pertenecen al patrimonio cultural (Videla, 1996). Dentro de los principales factores que están involucrados en el deterioro de los materiales pertenecientes al patrimonio cultural pueden mencionarse: a) procesos de biodeterioro, b) contaminación ambiental (elevadas temperaturas y humedades relativas) y c) contaminación antropogénica (creciente número de turistas). Los

factores ambientales como las elevadas temperaturas (frecuentes en las principales localidades de los monumentos arqueológicos de Iberoamérica), la humedad relativa y la polución natural y antropogénica juegan un papel decisivo en el tipo de deterioro (Videla, 1998). En los procesos de biodeterioro intervienen bacterias quimiolitotróficas, autotróficas y heterotróficas, hongos, algas, líquenes, musgos y plantas superiores. Entre las bacterias que atacan a los monumentos y edificios de piedra pueden mencionarse las tiobacterias, las silicobacterias y las bacterias nitrificantes. Estas últimas son capaces de transformar los nitratos en nitritos, los sulfatos en sulfuros, producen ácido nítrico, nitroso y sus sales de amonio que intervienen en la degradación del asbesto (Wasserbauer *et al.*, 1988).

2.3 Implicaciones en el biodeterioro del patrimonio cultural por biopelículas

Se han aislado bacterias autótrofas y heterótrofas de las superficies de rocas estructurales pertenecientes al patrimonio cultural en número elevado (Saiz Jiménez, 1994., Tayler y May, 1991). Se ha sugerido que éstas pueden atacar a la roca a través de procesos químicos y físicos relacionados con el metabolismo bacteriano (Warscheid *et al.*, 1991). Estos procesos a veces están asociados con los fenómenos de ensuciamiento o manchado de las rocas (Lewis *et al.*, 1988). Los hongos pueden degradar la roca tanto química como mecánicamente (Koestler *et al.*, 1988). Estos producen una amplia variedad de ácidos orgánicos e inorgánicos que pueden desmineralizar varios sustratos rocosos; debe mencionarse por ejemplo el caso de los actinomicetos que atacan a los monumentos de arenisca (Griffin *et al.*, 1991). McCormack *et al.*, (1996) observaron el ataque ácido del hongo *Aspergillus glaucus* en concreto. Las cianobacterias y las algas tales como clorofitas, crisofitas y diatomeas, forman costras pigmentadas que afectan al sustrato estéticamente y provocan deterioro físico y químico de la roca (Ortega *et al.*, 1991). Su presencia se reconoce a través de la formación de pátinas. Las cianobacterias epilíticas juegan un papel importante en la disolución del carbonato de la roca caliza, pudiendo provocar el desprendimiento de partes de la misma, debido a una disminución en la coherencia de los cristales alrededor de las colonias (Ortega *et al.*, 1991). Los líquenes están asociados con el deterioro de la roca de una manera similar a los musgos y a las plantas superiores (Monte, 1991). Por ejemplo, en el mármol los líquenes endolíticos pueden secretar ácido oxálico que lo atacaría, precipitando como oxalato de calcio hidratado y formando una pátina de oxalato. Este mecanismo de biodeterioro le fue atribuido también a las cianobacterias (Ortega *et al.*, 1991). Los musgos a través de los rizoides, pueden penetrar en la roca provocando agujeros («pitting») (García de Miguel *et al.*, 1995). La acción de las plantas vasculares en el deterioro de la roca puede ser mecánica, a través del crecimiento de raíces, o química, por la acidez de las raíces y diversos exudados (Saiz Jiménez, 1994). Los hongos aislados de las superficies de monumentos, de las fachadas de edificios y de concreto en descomposición, incluyen muchos géneros que son representativos de la flora del suelo y del aire. Esto sugiere la susceptibilidad del concreto por medio de microorganismos heterotróficos. Morton (2003), plantea haber aislado hongos a partir de concreto en descomposición en sótanos inundados.

2.3.1. Análisis de diversidad microbiana

El estudio de las comunidades microbianas se ha realizado tradicionalmente a través del empleo de los llamados “métodos cultivables”, los cuales involucran el aislamiento y cultivo de las diferentes especies de microorganismos presentes. Sin embargo, diversos trabajos indican que el empleo de este tipo de métodos solo garantiza hasta un 10% del total de los microorganismos presentes en las comunidades de estudio (Amman *et al.*, 1995). Lo anterior ha ocasionado que destaquen los métodos que involucran técnicas bioquímicas y moleculares, que han facilitado la identificación de funciones importantes en las bacterias (Lovell *et al.*, 2000). Uno de los métodos bioquímicos importantes es el análisis de ácidos grasos fosfolípidicos (PLFA, por sus siglas en inglés) que se usa para monitorear cambios en la constitución de las comunidades microbianas, para detectar grupos específicos de microorganismos, y para correlacionar biogeoquímicamente procesos fisiológicos con poblaciones específicas (Küsel *et al.*, 1999).

Por otra parte, se estima que aproximadamente el 1 % de los microorganismos existentes son cultivables con las metodologías y medios disponibles, lo cual significa que apenas estamos comenzando la verdadera exploración de la diversidad biológica. Para ello, se requiere utilizar herramientas moleculares, que sean capaces de obtener el material genético de todos los organismos presentes en un nicho determinado (mejor conocido como meta genoma), clonarlos y diferenciarlos individualmente. Este enfoque no solamente permite conocer la diversidad biológica, sino también explorar la existencia de actividades bioquímicas novedosas o incrementadas (Amman *et al.*, 1995). El análisis del meta genoma se ha centrado comúnmente en muestras de suelo (Berry *et al.*, 2003), sin embargo, han sido reportadas metodologías para ambientes marinos (Narváez-Zapata *et al.*, 2005), y para alimentos fermentados como el pulque (Escalante *et al.*, 2004). Es por ello que, con el desarrollo en los últimos años de metodologías de análisis genómico ambiental, es posible conocer a la microflora presente en muestras ambientales, incluyendo aquellos organismos no cultivables, mediante la secuenciación y análisis filogenético de la región 16S del ADNr (en el caso de arquea y eubacterias) y del 18S ADNr en el caso de la mico flora eucariótica.

2.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) es un rápido procedimiento usado para amplificar un segmento específico de ADN, técnica análoga al proceso de replicación del ADN que tiene lugar en las células. Este método es la técnica en biología molecular que más se ha utilizado en esta área en los últimos años. Una de las razones de su éxito es la simplicidad de la reacción y la facilidad para realizar cada una de las etapas, por lo que es usada en análisis

de ADN y en los análisis de los procesos celulares y moleculares (Walker y Rapley, 2000). Las aplicaciones de esta técnica son muy diversas, estas incluyen la clonación directa del ADN genómico o ADN complementario, mutagénesis *in vitro* e ingeniería del ADN, ensayos para detectar la presencia de agentes infecciosos, diagnósticos prenatales o enfermedades genéticas, análisis de la variación de secuencias alélicas y la secuenciación directa del ADN genómico y complementario. Para su implementación es necesario conocer las secuencias del ADN que flanquean el fragmento que se desea amplificar, y a partir de esta información, se pueden sintetizar químicamente los oligonucleótidos iniciadores o “primers” complementarios a cada una de las hebras de la doble hélice de ADN. Los reactivos requeridos para la PCR incluyen la enzima *Taq ADN polimerasa*, los eslabones de las hebras de ADN ó deoxirribonucleósidos trifosfatos (dNTP's) y el amortiguador apropiado para la enzima, el cual es generalmente optimizado con diferentes concentraciones de magnesio, un cofactor de la reacción de polimerización. Este último elemento es uno de los componentes críticos de la PCR, ya que no solo afecta a la enzima, sino también al ensamblaje de los oligonucleótidos (Walker y Rapley, 2000).

La técnica de PCR incluye tres etapas críticas definidas por tiempos y temperaturas específicas: 1) desnaturalización 2) alineación y 3) extensión. Cada una de estas etapas es repetida 30-40 veces en ciclos térmicos. En el primer ciclo la doble hebra template ó molde es desnaturalizada por calor a una temperatura de 90 °C, al separarse las dos hebras de ADN, la región de interés por ser amplificada se vuelve más accesible. La mezcla de reacción es enfriada a una temperatura entre 40 y 60 °C permitiendo que el grueso de las hebras se mantenga separadas, pero a la vez, permitiendo la hibridación de las secuencias pequeñas más homologas presentes, en este caso los oligonucleótidos adicionados, los cuales se encuentran presentes en exceso. Durante la última etapa caracterizada por la temperatura a 72 °C, se lleva a cabo la extensión del nuevo ADN, mediante la acción de una *ADN polimerasa* termoestable, la *Taq ADN polimerasa* (Walker y Rapley, 2000).

2.3.3. Utilización de oligonucleótidos universales para el estudio de las subunidades ribosomales microbianas

A partir de la información contenida en el banco mundial de genes (GenBank) es posible localizar regiones conservadas (altamente similares) entre los diferentes tipos de organismos. Dentro de estas regiones destacan para su estudio, a través de filogenia molecular, las subunidades pequeñas ribosomales de los diferentes organismos. Tal es el caso de las regiones V4 y V5 que contienen secuencias cortas presentes en la mayoría (80%) de los organismos reportados en el GeneBank (Schmalenberger *et al.*, 2001). De acuerdo a lo anterior se han desarrollado diversos juegos de oligonucleótidos “universales” de la región altamente conservada para amplificar por PCR la región interna divergente. Dicha amplificación puede ser llevada a cabo en condiciones altamente específicas, para asegurar la amplificación exclusiva de la secuencia V4 y V5 de la subunidad pequeña ribosomal, y los productos de PCR resultantes pueden ser analizados con técnicas de electroforesis especiales

para detectar los pequeños cambios resultantes de la región interna divergente en los diferentes organismos analizados (Schmalenberger *et al.*, 2001).

El análisis PCR-SSCP (Reacción en cadena de la polimerasa-Conformación polimórfica de banda única), aquí la secuencia blanco es marcada y amplificada simultáneamente por la PCR a partir del ADN genómico o los ADNc. Con este análisis, cambios en cientos de bases son detectados, en contraste con otras técnicas en las cuales cambios en secuencias relativamente cortas (desde muy pocas hasta 20 bases) son detectadas. Por tanto se deberá considerar que el análisis PCR-SSCP es mucho más sensitivo a la replicación de errores que ocurran durante la PCR. El 18S ADNr es un gen muy conservado, representado por múltiples copias repetidas en tándem en el genoma nuclear eucariótico. La alta conservación del gen 18S hace de este un marcador útil para la evaluación de relaciones filogenéticas (Palumbi, 1996) y como “ADN barcoding” (secuencias cortas de ADN utilizadas para la identificación estandarizada de microorganismos) en diversos organismos (Floyd *et al.*, 2002; Wong *et al.*, 2004, Countway *et al.*, 2005; Prez *et al.*, 2005). El ADNr tiene la ventaja de estar presente en múltiples copias y, por tanto ser fácilmente amplificado por PCR, semejante al ADN mitocondrial. Aunque algunos genes mitocondriales, específicamente COI y 16S, han sido ampliamente utilizados como ADN barcoding (Hebert *et al.*, 2003 a, b, 2004), ellos muestran una variabilidad superior comparada con el 18S, lo cual puede ser una limitante para la identificación de sitios iniciadores conservados a través de un amplio rango taxonómico (Hare *et al.*, 2000). A menudo en poblaciones biológicas, muchas muestras deben ser secuenciadas, aun muchos individuos podrían tener la misma secuencia. El análisis de conformación polimórfica de banda única, SSCP, ofrece un método simple, no caro y sensible para detectar si los fragmentos de ADN son idénticos en secuencia o no, y por tanto poder reducir grandemente la cantidad de secuenciaciones necesarias (Sunnucks *et al.*, 2000; Kanazawa *et al.*, 1986; Orita *et al.*, 1989a, b; Hayashi y Yandell, 1993).

2.4 Crecimiento y formación de la biopelícula

Las biopelículas son comunidades microbianas que podrían existir sobre superficies abióticas y algunas veces sobre superficies bióticas (Poulsen, 1999). Las investigaciones indican que las biopelículas pueden existir como una masa de micro colonias en una capa única o con canales verticales y horizontales permitiendo el flujo de líquidos y dispersión de nutrientes y componentes residuales (An y Friedman, 2000). Estas biopelículas podrían servir como fuentes de productos de contaminación (Brackett, 1992) y pueden ser reservorios para bacterias patogénicas o de deterioro (Sommer *et al.*, 1999). Una vez que la biopelícula se establece parece tener mayor resistencia a agentes antimicrobiales que aquellos organismos en estado libre (Plantónico) (Bolton *et al.*, 1988; Frank y Kolfi, 1990; Nickel y Costerton, 1992; Reid *et al.*, 1993).

Con el propósito de facilitar el estudio de la adherencia y colonización bacteriana, una variedad de métodos y observaciones experimentales han sido desarrollados como: Conteo

en placas estándar, y técnicas en rolo y sonicación los cuales son métodos indirectos que primero desprenden a los microorganismos de una superficie y posteriormente los contabilizan. Otros métodos indirectos son: bacterias isotópicamente marcadas, ensayos inmuno absorbentes de enzimas ligadas, ensayos biológicos, teñido de biopelículas bacterianas y procedimientos de micro titulación en platos; estos estiman el número de organismos adheridos *in situ* por medir algunos de sus atributos (An y Friedman, 2000). Algunos investigadores han encontrado que el método de conteo en platos da un estimado inseguro del número de microorganismos en la biopelícula y por tanto no debería ser utilizado en mediciones cuantitativas (Poulsen, 1999). Sin embargo otros investigadores han encontrado que el raspado de la superficie remueve hasta un 97 % de las células adheridas a placas de acero inoxidable (Jerong y Frank, 1994) y al agitarlo se remueve hasta un 99 % de las células adheridas a tubos de silicona (Anwar *et al.*, 1992). De acuerdo con Lindsay y von Holy (1997), la sonicación y el agitado con perlas, son métodos equivalentes basados en el conteo bacteriano. Los métodos que involucran observaciones directas, incluyen técnicas de microscopia (de luz, escaneado laser confocal, electrónica de transmisión y electrónica de barrido), pueden observar la colonización bacteriana de manera directa. Datos por microscopia de epifluorescencia pueden llevar a sobreestimar los niveles de la biopelícula, dado que el grosor no es medido y debido a sobreestimar el área cubierta por las células, además algunos polímeros extracelulares son teñidos (Blackman y Frank, 1996). A pesar de estos problemas, la microscopia directa para obtener resultados confiables cuando se estudian las bacterias adheridas a superficies (Lad y Costerton, 1990) sigue siendo utilizada. Por ejemplo la microscopia electrónica de barrido indicó que la sonicación y la agitación removieron únicamente a las células unidas a las capas superiores de la biopelícula, dejando un residuo de sustancias poliméricas extracelulares y células vivas intactas adheridas a capas inferiores (Lindsay y von Holy, 1997).

El procedimiento de micro titulación en placas (Ensayo en placas de 96 pozos) es un método indirecto para la estimación de bacterias *in situ* y puede ser modificado para diversos ensayos de formación de biopelículas (An y Friedman, 2000). En teoría el protocolo podría ser aplicado a cualquier especie que crezca amigablemente en el formato prescrito. En resumen las células son crecidas en una placa de micro titulación por un periodo de tiempo determinado y entonces los pozos son lavados para eliminar las bacterias en estado plantónico, las células que permanecen adheridas a los pozos son posteriormente teñidas con un azul que permita la visualización de la biopelícula adherida (Merrit *et al.*, 2005). O'Toole y Kolter (1998) utilizaron este ensayo con *Pseudomonas fluorescens* para evaluar el impacto de diversas condiciones de crecimiento y del medio ambiente y como una prueba rápida de evaluar mutantes deficientes de formar biopelículas. De igual forma Djordjevic *et al.*, (2002) utilizaron este método de micro titulación para determinar la formación de biopelículas por parte de un grupo de cepas de *Listeria monocytogenes* encontrando que a pesar de las deficiencias de este como un método indirecto, tuvieron resultados consistentes (bajas desviaciones estándar entre réplicas dentro de un mismo experimento y entre experimentos) con este método que con microscopia directa. Estos últimos autores también mostraron que el método de micro titulación tiene la ventaja de capacitar a los investigadores para analizar rápidamente la adhesión de múltiples cepas bacterianas o condiciones ambientales diferentes

dentro de un experimento; la mayor desventaja de este método según ellos es que es una indicación indirecta del nivel de la biopelícula producida dado que la adsorción del cristal violeta en la solución de destañido es usada como una indicación de la cantidad de bacterias en la biopelícula. Este sistema experimental, es más comúnmente conocido como ensayo en placa de 96 pozos es un método sencillo y de alto rendimiento utilizado para monitorear la adherencia bacteriana a una superficie abiótica (Merrit *et al.*, 2005).

2.5 Cinética del crecimiento microbiano

La cinética del crecimiento microbiano describe la relación entre la velocidad específica de crecimiento (μ) de una población microbiana y la concentración de sustrato (S), es una herramienta indispensable en todos los campos de la microbiología (Rova-Kovar y Egli, 1998). Los principios y definiciones de la cinética del crecimiento microbiano, son frecuentemente presentados tal y como fueron establecidos en la década de los 40 y en las décadas siguientes (Monod, 1942; 1949 y 1950) Utilizando esta metodología muchos esfuerzos han sido hechos para obtener datos experimentales coherentes (Koch, 1982; Jannasch and Egli. 1993). A pesar de lo anterior, existen pocos artículos publicados en las décadas recientes sobre revisiones (Rutgers *et al.*, 1991; Button, 1993; Grady *et al.*, 1996) y una monografía de esta aplicación (Panikov, 1995) que principalmente trata sobre la cinética de crecimiento y sus problemas. En contraste se ha puesto considerable atención a los aspectos cinéticos de modelación del crecimiento y remoción de sustrato para la biodegradación (Nielsen y Villadsen. 1992; Alexander, 1994; Hales *et al.*, 1997).

Aunque algunos de los autores anteriores tratan con cinética del crecimiento microbiano, comenzaron enfatizando los puntos de vista ecológicos, independientemente de que en la naturaleza los microorganismos crecen con mezclas de sustratos (Harder y Dijkhuizen, 1976 y 1982) y que su crecimiento no puede ser controlado por un nutriente único, pero si por dos o más nutrientes simultáneamente (Paerl, 1982; Rutgers *et al.*, 1990; Egli, 1991), y de que las propiedades cinéticas de una célula pudieran cambiar debido a adaptaciones (Hořfle, 1983; Rutgers *et al.*, 1987; Kova'Rova', 1996). En este trabajo, se realizó la cinética de crecimiento microbiano a las cepas bacterianas que reportan los mejores resultados en cuanto a formación de biopelículas y con miras a contar con la información que permita la multiplicación de estos microorganismos y su aplicación a mayores escalas de investigación y/o aplicación futura.

2.6 Bioprecipitación de carbonatos de calcio

La precipitación de carbonatos microbiológicamente inducida ha sido para la deposición de una capa superficial protectora con propiedades consolidantes e impermeabilizantes sobre la superficie de las rocas ornamentales (Biodeposición) (De Muynck *et al.*, 2010). En el proceso

patentado de “Calcite Bioconcept”, una capa de bacterias seleccionadas es esparcida sobre la superficie junto con un nutriente específico, además de iones de calcio (Adolphe *et al.*, 1990). Con el tiempo, esta capa es suministrada repetidamente con los medios nutrientes y eventualmente una capa de calcita es precipitada. Aunque los resultados de aplicaciones a gran escala demostraron una sostenibilidad y efectividad en cuanto a protección (Le Metayer-Levrel *et al.*, 1999), algunos autores comentaron sobre potenciales limitaciones de esta técnica: 1. Inefectividad para una consolidación en profundidad, 2. Formación de una película superficial consistente de una mezcla de remanentes biológicos y 3. La posibilidad de un crecimiento bacteriano no controlado y formación de biopelículas (Tiano *et al.*, 1999; Rodríguez-Navarro *et al.*, 2003). Esto ha llevado a una variedad de artículos de investigación en los cuales diferentes cepas de cultivos axénicos y diferentes vías metabólicas fueron propuestas como una forma de superar las limitaciones antes mencionadas. Tiano *et al.*, (2006), desarrolló una técnica de precipitación de carbonato en la cual el uso de microorganismos fue omitida. Una revisión detallada de las diferentes metodologías es dada en el artículo de revisión por De Muynck *et al.*, (2009).

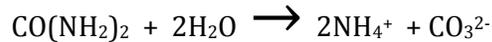
La precipitación de carbonato de calcio se refiere a cuatro factores claves: 1. La concentración de carbono inorgánico disuelto, 2. El pH, 3. La concentración de iones de calcio y 4. La presencia de sitios de nucleación/o desarrollo de cristales para la nucleación. Además, diversos parámetros ambientales tales como la temperatura y salinidad de la suspensión tienen influencia sobre el proceso de precipitación (Knorre y Krumbein, 2000; Rivadeneyra *et al.*, 2004). Diversos procesos metabólicos influyen directamente los primeros tres factores claves, mientras que las características físicas y químicas de las células bacterianas pueden hacer que estas actúen como sitios de nucleación de cristales (Hammes y Verstraete, 2002).

Se pensaba que el tipo de microorganismo podía tener consecuencias sobre la profundidad de penetración del tratamiento y sobre la posibilidad de formación de biopelículas. El uso de bacterias con facilidad de movimiento y deslizamiento, podrían por tanto resultar en una gran profundidad de penetración. Por otra parte, los problemas relacionados con la germinación y el crecimiento no controlado de la biopelícula podrían evitarse si se utilizaran bacterias no formadoras de esporas (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2003; Jimenez-Lopez *et al.*, 2007).

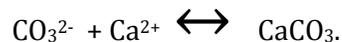
La vía metabólica utilizada por la bacteria tiene influencia sobre la velocidad de producción de carbonatos, y de ahí, sobre la velocidad de precipitación de carbonato de calcio. Para deposiciones sobre roca caliza, la producción de carbonatos a menudo se basaba en la utilización de ácidos orgánicos suministrados (Tiano *et al.*, 1999; May, 2005) y/o la desaminación oxidativa de aminoácidos suministrados (Le Metayer-Levrel *et al.*, 1999; Rodríguez-Navarro *et al.*, 2003). Investigaciones recientes se han enfocado a la producción de carbonato ureolítico (Hammes *et al.*, 2003 a, b; Dick *et al.*, 2006; De Muynck *et al.*, 2008 a, b). La hidrólisis de la urea presenta un común y sencillo proceso microbiano que puede ser fácilmente utilizado para aplicaciones biotecnológicas. En contraste con otras vías la producción de carbonato por la hidrólisis de la urea puede ser fácilmente controlada.

Además, es posible de obtener la producción de altas concentraciones de carbonatos dentro de periodos cortos de tiempo (Castanier *et al.*, 1999).

La enzima ureasa cataliza la hidrólisis de urea ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) a carbonato y amonio, produciendo un incremento del pH y la concentración de carbonato en el ambiente bacteriano:



En presencia de iones de calcio, la solución puede llegar a ser sobresaturada con respecto al carbonato de calcio, llevando a su precipitación, según el siguiente equilibrio:



En contraste con las investigaciones relacionadas con los aspectos microbianos, poca o ninguna atención se ha puesto a la influencia de los parámetros químicos, por ejemplo la concentración de iones de calcio y nutrientes sobre la eficiencia del tratamiento de biodeposición. Las concentraciones de estos componentes son importantes porque ellos influyen la cantidad y tipo de precipitados que son formados (Jimenez-Lopez *et al.*, 2008).

Rodriguez-Navarro *et al.*, (2003), reportaron la importancia de los precipitados polimórficos (calcita o vaterita) sobre la eficiencia del tratamiento de biodeposición. La presencia de cristales romboédricos de calcita bien desarrollados (obtenidos con el medio M3-P, utilizado por estos autores) resultó en un más pronunciado efecto consolidante comparado con los pequeños cristales aciculares de vaterita. Estos autores concluyen que la manipulación de la composición de los medios de cultivo podría ser utilizada para controlar los procesos de biodeposición. De Muynck *et al.*, (2009), plantean que las diferencias en morfología podrían también ser atribuidas a las diferencias en concentraciones de calcio (además de la presencia de fosfato en los medios, a como lo atribuyen Rodriguez-Navarro *et al.*, 2003) entre los dos medios utilizados por los primeros autores mencionados. Jimenez-Lopez *et al.*, (2008), investigaron el uso de diferentes medios para la precipitación de carbonato de calcio inducida por bacterias que habitan la roca, concluyendo que la elección de un medio de cultivo apropiado, podría prevenir alteraciones en la porosidad de la roca.

Las diferencias en condiciones experimentales entre los grupos de investigación que están trabajando sobre biodeposición, hace que sea muy difícil de evaluar la importancia de los microorganismos y sus vías metabólicas sobre la eficiencia de los tratamientos. Más específicamente, variaciones en las dosis de sales de calcio utilizadas podrían explicar una gran parte de las diferencias observadas en eficiencia por los diversos tratamientos. Posteriormente, una comparación cuantitativa es aun más difícil de desarrollar, debido al hecho de que diferentes autores utilizan diferentes parámetros y procedimientos de evaluación. Algunos autores se enfocan sobre los efectos impermeabilizantes (Dick *et al.*, 2006), mientras que otros han investigado el efecto de fortalecimiento (Rodriguez-Navarro *et*

al., 2003; Jimenez-Lopez *et al.*, 2007). Además de estos dos efectos, Tiano *et al.*, (1999) posteriormente propuso la evaluación de los aspectos visuales antes y después del tratamiento por medio de análisis colorimétricos.

De Muynck *et al.*, (2010) investigaron la influencia de las dosis de urea y calcio y por tanto la cantidad de carbonato precipitado sobre la eficiencia del tratamiento de deposición. En esta investigación los autores analizaron los efectos de incrementar las dosis de urea y calcio en el medio de deposición a la vez que incrementaron el número de aplicaciones a realizar. Su enfoque principal fue tanto la impermeabilización como los efectos consolidantes, a la vez que examinaron los efectos de la deposición sobre los aspectos cromáticos de la roca. Estos autores concluyen entre otras cosas en que, se observaron grandes cristales romboédricos característicos de la calcita a la concentración 10/25 de urea y cloruro de calcio di hidratado, respectivamente (Figura 3), a la vez que atribuyen a la presencia incrementada de iones cloruro (con el incremento de las dosis de calcio) la obtención de algunas de las morfologías observadas en la Figura 3. Por otra parte, el incremento en las dosis de calcio podría llevar a una precipitación sobre otras superficies ajenas a la superficie bacteriana, trayendo consigo que no disminuya la actividad ureolítica de las bacterias por muerte de las mismas y por ende trayendo como consecuencia una mejora en la precipitación de carbonatos de calcio aunque no en la proporción teóricamente esperada. Finalmente y como resultado de este estudio, parece ser que para una cantidad dada de células retenidas en la roca debería existir una dosis óptima de urea y calcio, por encima de la cual los efectos benéficos para una precipitación adicional de carbonato de calcio y un incremento de los efectos protectores podrían ser mucho más pequeños comparados con los efectos nocivos debida a la acumulación de sales y urea en los poros y decoloraciones en la roca.

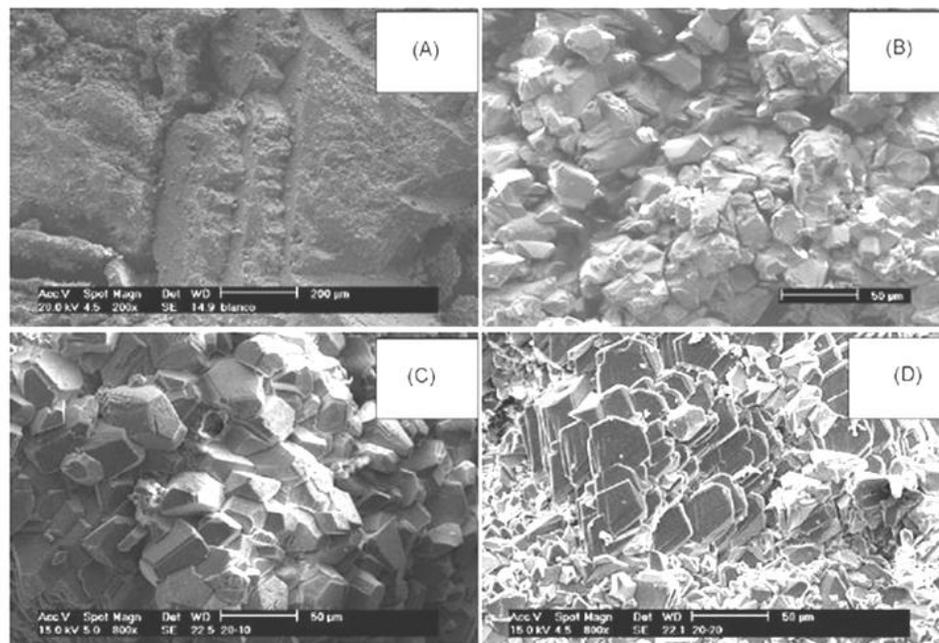


Figura 3. Aspecto microscópico de la superficie de una muestra de roca caliza no tratada (A) y aquellas tratadas con *B. sphaericus* a concentraciones variables de urea y cloruro de calcio en el medio de deposición: 5/12.5 (B), 10/25 (C) y 20/50 (D). Modificado de De Muynck *et al.* (2010).

La precipitación de cristales de carbonato de calcio ocurre por nucleación heterogénea sobre la pared de la célula bacteriana (Figura 4A), una vez que la supersaturación ha sido alcanzada. Las tecnologías de biodeposición están actualmente siendo utilizadas para la consolidación de columnas de arena (Ferris y Stehmeier, 1992; Nemati y Voordouw, 2003), para reparar monumentos (Figura 4B) de roca caliza (Dick *et al.*, 2006; Tiano *et al.*, 1999; Rodríguez-Navarro, 2003), y para la remediación de pequeñas extensiones en concretos fracturados (Bang *et al.*, 2001; Ramachandran *et al.*, 2001; Bachmeier *et al.*, 2002). Experimentos sobre el tiempo de vida útil realizados sobre monumentos de roca caliza han mostrado un efecto protector de la capa de calcita depositada por la bacteria por varios años. Se ha sugerido que un nuevo tratamiento debería ser aplicado cada diez años (Castanier *et al.*, 1999; De Muynck *et al.*, 2009).

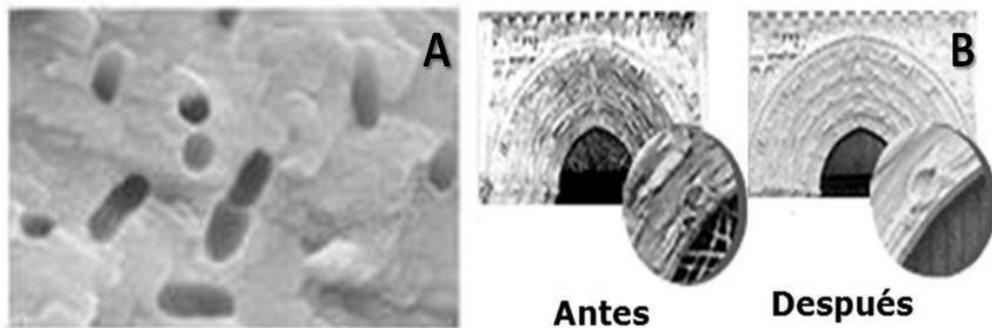


Figura 4. Composición de imágenes de la precipitación de CaCO_3 (A, Tomado de De Muynck *et al.*, 2008b), y un ejemplo de un monumento antes y después de restaurado (B, Tomado de Tiano *et al.*, 1999.).

2.7 Técnicas de análisis de la conformación de la roca en monumentos.

2.7.1 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y Difracción de rayos X (EDX)

La Microscopía electrónica de barrido (SEM) es un instrumento que permite la observación y caracterización superficial de materiales inorgánicos y orgánicos, entregando información morfológica del material analizado. A partir de él se producen distintos tipos de señal que se generan desde la muestra y se utilizan para examinar muchas de sus características. Con esta técnica se pueden realizar estudios de los aspectos morfológicos de zonas microscópicas de distintos materiales, además del procesamiento y análisis de las imágenes obtenidas. Las principales utilidades del SEM son la alta resolución ($\sim 100 \text{ \AA}$), la gran profundidad de campo

que le da apariencia tridimensional a las imágenes y la sencilla preparación de las muestras. El microscopio electrónico de barrido puede estar equipado con diversos detectores, entre los que se pueden mencionar: un detector de electrones secundarios para obtener imágenes de alta resolución, un detector de electrones retrodispersados que permite la obtención de imágenes de composición y topografía de la superficie, y un detector de energía dispersiva que permite coleccionar los Rayos X generados por la muestra y realizar diversos análisis e imágenes de distribución de elementos en superficies pulidas (Zegarra y Montesinos, 2010).

La técnica de difracción de rayos X ha sido ampliamente utilizada en la caracterización de materiales, que cumplen con la condición de tener una estructura cristalográfica definida, pues la información obtenida de la interacción entre los rayos X y los cristales se basa en la difracción producida por un conjunto de átomos en un arreglo ordenado. La difracción de los rayos X por materiales cristalinos es, esencialmente, un proceso de dispersión coherente. Esta radiación coherente se origina por el choque de los fotones incidentes contra los electrones firmemente ligados a los átomos. Cada átomo irradiado del material dispersa de manera individual en todas las direcciones. Dado que un material está formado por muchos átomos y cada uno de ellos es una fuente de radiación coherente, ocurren fenómenos de interferencia constructiva o destructiva entre los rayos X dispersados. En determinadas direcciones del espacio, los rayos dispersos están en fase y producen interferencia constructiva de ondas, y es en estas direcciones en donde se observan máximos de intensidad en la difracción. Una descripción simple del proceso de difracción de rayos X se logra mediante la ley de Bragg (Betancourth *et al.*, 2010).

La roca utilizada para construir monumentos, estatuas y fachadas de edificios, poseen superficies que presentan grandes áreas ideales para la adhesión de los hongos (Gorgbuschina, 2007). El crecimiento de hongos en forma de incrustaciones negras, puede alterar las propiedades estéticas de las rocas (Sterflinger, 2005); mientras el deterioro físico ocurre en la medida en que las hifas de los hongos penetran la superficie, hinchando el material y secretando ácidos (Konkol *et al.*, 2010). Esos eventos someten a la roca a estrés físico y químico que provocan su desintegración. Cepas de microorganismos quimiorganotróficos tales como *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Ulocladium* y *Phoma* que secretan ácidos orgánicos u oxidantes del hierro y del manganeso de los materiales, han sido aislados de las rocas (Warscheid y Braams, 2000). Recientemente, la precipitación bacteriana de carbonatos ha sido propuesta como un método ambientalmente amigable para proteger las rocas ornamentales deterioradas (De Muyndck *et al.*, 2009).

3. JUSTIFICACIÓN

En la ciudad de México existen una gran cantidad de monumentos considerados patrimonio histórico que presentan signos de daño, degradación y destrucción debido al incremento de la contaminación, factores medioambientales y biológicos. Aun cuando gran parte del deterioro es causado por microorganismos en biopelículas epilíticas, existe un completo desconocimiento acerca de su diversidad, la forma en que se implican en el proceso de biodeterioro y su uso en otras posibles aplicaciones encaminadas a la restauración de este patrimonio histórico.

El estudio de los objetos del patrimonio cultural debería ser efectuado, si es posible, sin modificar el objeto en sí, especialmente cuando éstos son de pequeñas dimensiones (Michaelsen *et al.*, 2009). Los métodos usados en la actualidad para la detección y medición de biomasa microbiana, tales como conteo de colonias, estimación microscópica de biovolúmenes y análisis de ergosterol son caros y consumidores de tiempo o son inapropiados para algunos casos. Si a esto añadimos las dificultades señaladas con los métodos tradicionales de cultivo, podemos concluir en la urgencia de desarrollar trabajos que involucren no sólo el uso de técnicas tradicionales de cultivo, sino las técnicas moleculares con el consecuente resultado de poder contar con aislados microbiológicos que nos permitan identificar microorganismos hasta ahora no detectados y que pudiesen estar afectando el patrimonio cultural de la nación mediante su biodeterioro. Adicionalmente, el disponer de estos aislados permitirá incursionar en técnicas biológicas novedosas como la bioprecipitación (biomineralización) de cristales de carbonato de calcio (generalmente calcita), cuya aplicación a materiales de concreto ha demostrado ser muy eficiente e incrementar la impermeabilidad y disminuir la absorción del agua, con el consecuente incremento de la durabilidad de la infraestructura (Achal *et al.*, 2011; Hui *et al.*, 2011). El conocimiento de la diversidad microbiana existente y la aplicación de estas técnicas novedosas, junto a otras ya en uso, nos permitirán en un futuro una mejor y mayor protección del patrimonio cultural.

4. HIPÓTESIS

"Los microorganismos aislados de las biopelículas epilíticas del área de estudio poseen diferentes potenciales biotecnológicos relacionados con el biodeterioro y preservación de la infraestructura".

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar polifásicamente las biopelículas microbianas epilíticas colectadas en superficies asociadas al Castillo de Chapultepec.

5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Aislar e integrar una colección de microorganismos a partir de las biopelículas epilíticas de estudio.

Establecer los haplotipos moleculares por *rep*-PCR y *eric*-PCR de la colección de microorganismos epilíticos aislados.

Identificar por su secuencia ribosomal (16S rADN en bacterias y 28S rADN en hongos) las identidades de los aislados obtenidos.

Caracterizar el potencial de formación de biopelícula de los microorganismos representativos de las biopelículas epilíticas de estudio.

Evaluar el potencial de biomineralización de las especies representativas de las biopelículas epilíticas de estudio y que eventualmente pudiesen servir para la restauración de superficies urbanas asociadas al sitio de estudio.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Descripción del área de muestreo

Inicialmente se hizo un reconocimiento del lugar de estudio, El Castillo de Chapultepec ubicado en lo alto del cerro del mismo nombre, en el centro del Bosque de Chapultepec, situado en la ciudad de México y se definieron los mejores puntos para la recolección de las muestras considerando los diferentes aspectos climatológicos que intervienen en la formación de la biopelícula como son: exposición a la luz solar, temperatura, incidencia del aire, humedad, entre otros (Videla *et al.*, 2003), además de la contaminación ambiental presente en los alrededores del castillo. Las muestras fueron tomadas en abril del 2009.

6.2 Toma de muestras y aislamiento microbiológico

Para el aislamiento e identificación de microorganismos a partir de biopelículas epilíticas de superficies asociadas al Castillo de Chapultepec, se eligieron tres puntos en la zona del Castillo, los cuales fueron: puntos I y II relacionados con los cimientos del muro perimetral del Castillo ubicados a unos 100 y 150 metros de distancia respectivamente de la puerta de ingreso principal a Chapultepec, y un punto III ubicado en un monumento en el patio lateral del Castillo, en el cual se observó deterioro de la roca, grandes desprendimientos de la misma y zonas fracturadas. Los muestreos se realizaron en forma aséptica (Figura 5A) utilizando técnicas no invasivas. Las biopelículas se desprendieron de la superficie de las paredes seleccionadas para el estudio con una espátula metálica (Figura 5B) estéril y se colocaron en frascos estériles que luego se transportaron al laboratorio. De acuerdo a las posibilidades, la muestra en ocasiones fue tomada en forma de pequeños trozos de un área superficial aproximada de 2 cm² y una profundidad de 5 mm aproximadamente, en condiciones estériles para su posterior traslado hacia el laboratorio. Además se tomaron muestras con hisopos para medios líquidos previamente definidos y que permitieron el crecimiento de un amplio espectro de microorganismos que pudiesen estar presentes en el lugar de muestreo, por ejemplo: medio a base de Triptosa, Glucosa y Extracto de levadura (TGY), Medio Agar, papa y Dextrosa (PDA) medios y en caldos. De la misma forma se utilizaron medios sólidos preparados en placas Petri de los mismos caldos y se incluyó el medio a base del filtrado del jugo comercial V-8 adicionado con agar, éstas fueron inoculadas en el sitio a partir de muestras tomadas con palillos estériles. Con esto se garantizó el obtener un amplio espectro de microorganismos que pudiesen crecer tanto en los caldos como en los medios sólidos.

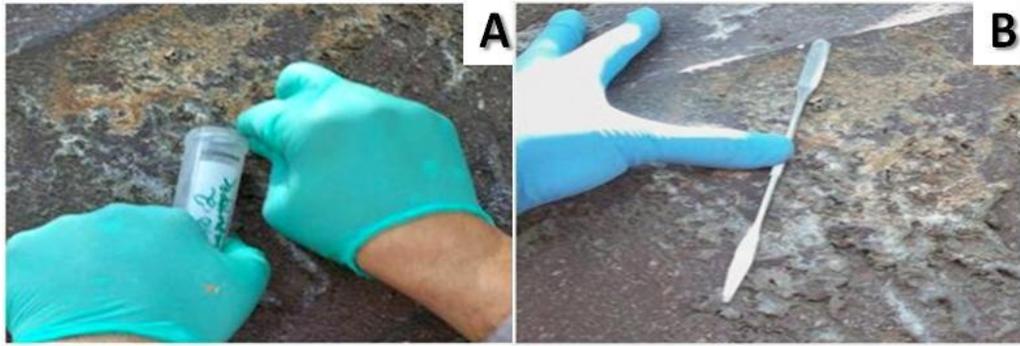


Figura 5. Forma en que fue tomada y conservada la muestra (A). Tamaño de biopelículas en comparación al tamaño de la espátula (B).

6.2.1. Aislamiento e identificación de microorganismos presentes en la muestra

Una vez tomadas las muestras tal y como se indicó en el punto anterior, fueron trasladadas al laboratorio lo más rápidamente posible, cuidando de que las placas estuviesen bien cerradas para evitar cualquier contaminación ambiental, lo mismo que los tubos en los que se trasladó los medios líquidos inoculados. Ya en el laboratorio, se procedió a incubar las muestras tomadas en medios sólidos a temperaturas entre 28 y 30 grados Celsius, que es la temperatura en la que crecen un amplio rango de microorganismos mesófilos que pudiesen coexistir en el lugar de muestreo. Diariamente se revisaron las placas para determinar el momento en que serían retiradas de la incubadora, en función del crecimiento que se observó y del tipo de microorganismos que pudiesen identificarse desde el punto de vista morfológico. Los medios líquidos por su parte, fueron puestos a condiciones de atmosfera controlada y en agitación continua por un periodo de 24 a 48 horas, observando el crecimiento por medio del enturbiamiento de los medios en comparación con testigos no inoculados. Cada 48 horas, se tomaron muestras de los medios líquidos consistentes en 100 micro litros (μL) de muestra y llevados a medios sólidos similares a los ya usados para las placas y se pusieron a incubar en las mismas condiciones descritas con anterioridad. Este proceso de cultivo en placa cada 48 horas para los medios líquidos se mantuvo por un periodo de hasta 12 días, en que se mantuvieron los tubos en agitación continua y se consideró agotado el proceso de aislamiento microbiano a partir de estos medios.

Una vez concluida la etapa anterior, se procedió al aislamiento de cada especie observada según su morfología en el crecimiento de las placas hasta determinar que se contaba con cultivos puros, tomando en cuenta si se trataba de un hongo levaduriforme, de un hongo filamentoso o de una bacteria en apariencia y del resultado de su observación al microscopio. Posteriormente se realizó la identificación de cada microorganismo o grupos de microorganismos, para lo cual se hizo uso de las diferentes técnicas microscópicas (tinciones, gotas húmedas y microcultivos, entre otras) y técnicas específicas como tinción Gram, además de observaciones morfológicas.

Finalmente se identificaron los microorganismos levaduriformes haciendo uso de métodos de identificación rápida por medio de pruebas bioquímicas como el API 20 C AUX (bioMerieux) para levaduras. Para las pruebas bioquímicas de las levaduras identificadas por medio del API 20 C AUX, fue necesario sembrar estos cultivos en medio RAT con el propósito de determinar si las mismas formaban o no pseudohifas, de manera que se incubaron y se tomó muestras que fueron observadas al microscopio a las 24, 48 y 72 horas, haciéndose la última observación a los ocho días de incubación a 30 °C.

Los hongos filamentosos fueron identificados hasta donde fue posible por medio de sus características morfológicas al observar los conidioforos que producen al microscopio de luz (100 X), su crecimiento en placa a diferentes pH (3.6; 5.6; 7.6 y 9.6) por espacio de 5 a 7 días en incubación a 30 °C, coloración del frente y reverso de la placa, forma y color de la conidia, horas transcurridas para la aparición de la primera conidia según cada pH en estudio. En algunos casos se requirió de la técnica de microcultivo para lograr observar la espora al microscopio.

Una vez aislados y purificados los microorganismos se preservaron en glicerol al 86 % y almacenados a - 70 °C hasta su utilización. En el caso de los aislados bacterianos se obtuvieron alrededor de 70 aislados que fueron igualmente enviados a preservación a -70 °C, estos solamente se observaron al microscopio para separar bacterias de levaduras inicialmente y se decidió pasar directamente a la extracción del ADN e identificarlas por secuenciación.

6.3 Extracción de ADN

Para la extracción del ADN, alícuotas de aproximadamente 0.5 g de las muestras colectadas o de cultivos puros crecidos a 29 °C en agar de papa y dextrosa (PDA por sus siglas en inglés) para el caso de levaduras y hongos filamentosos (ADN genómico) y caldo Luria-Bertani (LB) para bacterias, fueron transferidos a tubos de 1.5 mL. La extracción del ADN se llevó a cabo siguiendo el protocolo de silica (Rojas-Herrera *et al.*, 2008) en el caso de hongos filamentosos. Para esto, a tubos de microrreacción de 1.7 mL (conteniendo la muestra a extraer) se les adicionó 1 mL de amortiguador TEN (100 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, pH 8.0) y se agitó por 1 min. Posteriormente se centrifugó por 10 min a 10000 g a temperatura ambiente, la pastilla fue lavada dos veces bajo las mismas condiciones y finalmente se re suspendió en un 1 mL de amortiguador TEN con 0.2 mg de lisozima adicionada y se incubó por 1 hora a 37 °C bajo condiciones de agitación suave. Después de la incubación, se dieron tres ciclos de enfriamiento en hielo y luego puesto a 37 °C por finalmente ponerlos por 5 min a 65 °C. Una alícuota de 100 µL de SDS al 20 % fue adicionado, agitando por 1 min e incubando por 30 min a 37 °C. Después se centrifugó por 10 min a 10000 X g a temperatura ambiente, el sobrenadante fue transferido a nuevos tubos y 500 µL de solución de acetato de sodio 5 M fueron adicionados e incubados a 65 °C por 5 min. Los tubos fueron puestos a -20 °C por 20 min y centrifugados a 20000 X g por 30 min a 4 °C. El sobrenadante fue transferido a

un Nuevo microtubo y se adicionaron 200 μ L de suspensión de sílica e incubado a temperatura ambiente por 2 min con agitación suave. El complejo sílica-ADN fue recuperado por centrifugación a 16000g por 2 min a RT y se lavó la pastilla adicionando 1 mL de etanol al 70 %. El ADN fue separado de la sílica con 50 μ L de agua destilada estéril e incubada a 55 °C por 5 min y recuperado por centrifugación a 16000g por 5 min a temperatura ambiente.

Para el caso de levaduras y bacterias, el ADN de estas fue extraído por medio del método Fenol-Cloroformo (Raeder y Broda, 1985). Partiendo de 40 a 50 mg de muestra previamente congelada por una noche a -70 °C o bien puestas en nitrógeno líquido por 20 min, se maceró la muestra por 5 min con un pistilo estéril. Al macerado anterior se adicionaron 500 μ L de amortiguador de extracción a temperatura ambiente (200 mM tris HCL pH 8.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5 % SDS). Se homogenizó la muestra y se incubó por 10 Min. Se añadió 500 μ L de fenol-cloroformo (50/50) a 4 °C y se mezclaron agitando a máxima velocidad durante 5 minutos. Se centrifugó a 1300 rpm durante 30 min. La fase acuosa se transfirió a otro tubo eppendorf y se adicionaron 400 μ L de cloroformo frío (-20 °C). Se mezcló durante un minuto en agitación y se centrifugó durante 5 min a 1300 rpm. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo. Se adicionaron 8 μ L de ARNasa (10 mg/mL). Se incubó durante 30 min a 37 °C en block caliente. Se adicionaron 500 μ L de isopropanol frío (4 °C) y se mezcló por inversión ligera, finalmente se incubó a -20 °C durante 15 min y se centrifugó durante 5 min a 13000 rpm. El sobrenadante se desechó y se añadieron 500 μ L de etanol al 70 % (-20 °C), se mezcló por inversión ligera y se centrifugó durante 5 min a 13000 rpm. El sobrenadante se desechó y la pastilla se secó en papel secante durante 30 min. La pastilla seca se resuspendió en 50 μ L de agua miliQ estéril (ambiente) y se mantuvo a 4 °C (Raeder y Broda, 1985).

6.4 Determinación de la calidad del ADN por electroforesis

La determinación de la calidad del ADN se realizó por electroforesis horizontal en gel de agarosa. Este proceso se llevó a cabo en aproximadamente 50 mL de gel de agarosa diluido al 1% en amortiguador TAE 1X (40 mM Tris base, ácido acético glacial y 2 mM ácido etilendiaminotetraacético), adicionado con bromuro de etidio en una concentración de 0.5 μ g/mL. Se colocaron aproximadamente 10 μ L de muestra en cada pozo usando como colorante de corrida azul de bromofenol 6X diluido 1:10 (Sambrook *et al.*, 1989). La electroforesis se realizó a 80 V durante 45 minutos, empleando como amortiguador de electroforesis TAE 0.5X; una vez finalizado el proceso se visualizó el gel en un transiluminador de UV Kodak Gel Logic 112 y se documentaron los resultados fotográficamente.

6.5 Protocolos para la amplificación de los hongos en estudio

6.5.1 ADN utilizado y oligonucleótidos empleados para las amplificaciones

Un microlitro de ADN purificado fue utilizado para el desarrollo de la PCR. La reacción de PCR fue desarrollada según lo descrito por Heuer *et al.*, (2002). Se utilizaron tres oligonucleótidos reportados previamente para la amplificación de las regiones filogenéticas conservadas de la subunidad 18S ribosomal de eubacterias y 16S ribosomal de arqueobacterias. El oligonucleótido en sentido ó Com1 es: 5' CAG CAG CCG CGG TAA TAC 3' y el oligonucleótido en anti sentido ó Com2-Ph es: 5' CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT 3' (Schwieger y Tebbe, 1998). Adicionalmente, se probaron los oligonucleótidos propuestos por Strom y colaboradores, (2002) (16S-for 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' y 16S-Rev 5'-CGGGAACGTATTCACCG-3') bajo las mismas condiciones. Los hongos levaduriformes y mohos fueron determinados empleando la región 26S del ADN ribosomal. Se utilizaron los oligonucleótidos NL1 (5' GCATTCAATAAGCGGAGGAAAAG 3') y NL4 (5' GGTCCGTGTTTCAAGACGG 3') (White *et al.*, 1990).

6.5.2 Amplificaciones por PCR para levaduras y hongos filamentosos

Las amplificaciones por PCR para levaduras y hongos filamentosos fueron llevadas a cabo en un volumen de reacción de 25 µL que contenía los ADN muestra (80 ng de ADN purificado), 10 x PCR amortiguador (Invitrogen, Carlsbad, California, EEUU) 2.5 µL , 0.75 µL MgCl₂ (50 mM), 1 µL de iniciadores (5 mM) NL-1 y NL-4, 0.2 µL de cada dNTP (10 mM), 0.5 µL of BSA (suero albumina bovina) y 0.2 µL de Taq polimerasa (BIO-LINE, 5 U/ µL). Las condiciones para el termociclador en el caso de levaduras y hongos filamentosos fueron; una etapa inicial de desnaturalización: 94 °C por 5 min, seguida por 35 ciclos a 94 °C por 0.30 min, 60 °C por 0.30 min y 72 °C por 1 min con una extensión final de 72 °C for 7 min. Las huellas genómicas de las amplificaciones fueron visualizadas en gel de agarosa al 1.5 % bajo luz ultravioleta. Para el caso de bacterias con iniciador 16 S y Com, las amplificaciones fueron llevadas a cabo en un volumen de reacción de 25 µL que contenía los ADN muestra (80 ng de ADN purificado), 10 x PCR amortiguador (Invitrogen, Carlsbad, California, EEUU) 2.5 µL , 0.75 µL MgCl₂ (50 mM), 1 µL de iniciadores (5 mM) 16 S Sentido y 16 S Antisentido, 0.25 µL de cada dNTP (10 mM), 0.5 µL de BSA y 0.2 µL de Taq polimerasa (BIO-LINE, 5 U/ µL). Para el oligonucleotido Com y bacterias se utilizan 0.50 µL MgCl₂ (50 mM), se aumentó dNTP (10 mM) a 0.5 µL al igual que la Taq polimerasa (BIO-LINE, 5 U/ µL) a 0.5 µL, manteniendo las condiciones de reacción anteriores. Las condiciones para el termociclador en el caso de bacterias fueron; una etapa inicial de desnaturalización: 94 °C por 5 min, seguida por 35 ciclos a 94 °C por 1.25 min, 55-60 °C por 1.30 min y 72 °C por 1 min con una extensión final

de 72 °C for 7 min. Las huellas genómicas de las amplificaciones fueron visualizadas en un gel de agarosa al 1 % bajo luz ultravioleta.

6.5.3 Amplificaciones por *rep*-PCR

La amplificación por *rep*-PCR fue llevada a cabo en un volumen de 25 µL de reacción que contenía el ADNr a amplificar (80 ng de ADN purificado), amortiguador 10x para PCR (2.5 µL), MgCl₂ 50 mM 0.75 µL, Iniciadores REP 1R (5'-III ICG ICG ICA TCI GGC-3') y REP 2R (5'-ICG ICT TAT CIG GCC TAC -3') (Louws *et al.*, 1999), 0.5 dNTP µL, 0.5 µL de BSA (Bovine Serum Albumine) y 0.5 µL de Taq polimerasa (BIO-LINE, 5 U/ µL). Las condiciones para la amplificación por PCR fueron de una etapa de desnaturalización inicial de 95 °C por 5 min, seguida de 30 ciclos a 95 °C por 0.30 min, T_m en touchdown de 50 a 58 °C por 1 min y 65 °C por 4 min con una extensión final de 65°C por 7 min. Tanto para la amplificación por *rep*- como por *eric*-PCR, la huella genómica fue visualizada en gel de agarosa al 2 % bajo luz ultravioleta.

6.5.4 Amplificaciones por *eric*-PCR

La amplificación por *eric*-PCR fue desarrollada en un volumen de reacción de 25 µL que contenía el ADNr a ser amplificado (80 ng de ADN purificado), 2.5 µL de los iniciadores ERIC 1R (5'-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3') y ERIC 2R (5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3') (Hulton *et al.*, 1991), las restantes condiciones de reacción y para el termociclador fueron similares a las utilizadas con la amplificación por *rep*-PCR.

6.6 Secuenciación y análisis de secuencias

La secuenciación de los productos de PCR correspondientes a cada microorganismo fue realizada en un secuenciador automático ABI 320 para secuenciación en columnas. Las condiciones de secuenciación se describen según lo mostrado en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Condiciones de secuenciación (A) y del termociclador para hongos filamentosos (B).

A		B				
Componentes	1X	96 °C	58 °C	62 °C	4 °C	Ciclos
Tampon byg dye	4 µL	1.0 min	-	-	-	1X
H2O	9 µL	10 Seg	5.0 Seg	4.0 min	-	25 X
Iniciador F	1 µL	-	-	1.0 min	-	1X
Byg dye	4 µL	-	-	-	5.0 min	1X
Templado	2 µL					
Volumen total	20 µL					

Para el caso de los hongos, los productos de PCR se sometieron a esta reacción de secuenciación y se pasaron a reacción de purificación siguiendo el protocolo dado a continuación: A 20 µL de la reacción de secuenciación se le adicionaron; 2 µL EDTA, 2 µL NaOAC 3M pH 5.2 (Sigma, EEUU) ,50 µL de etanol absoluto (Merck 200, Alemania). Se mezcló levemente (Manual o agitación mecánica), y se incubó a -20 °C por 15 min. Posteriormente la solución se centrifugó a 14000 rpm por 15 min a 6 °C y se eliminó el sobrenadante. Se le adicionaron 70 µL de etanol al 70 % y se mezcló levemente (Manual o agitación mecánica). La solución fue incubada a -20 °C por 15 min, centrifugada a 14000 rpm por 15 min a 6 °C y se eliminó el sobrenadante. La pastilla se secó a 70 °C por 20 a 30 min. El producto de PCR se resuspendió en 10 µL de HI-di formamide (Formamida des ionizada) y se desnaturaliza a 95 °C por 5 min, y se conservó en hielo hasta el momento en que se cargó al secuenciador.

Para el caso de las bacterias se siguió el proceso de purificación a partir de producto de la reacción de secuenciación utilizando el sistema *Big Dye X Terminator Purification* (Applied Biosystem, EEUU) como se detalla a continuación: en un tubo nuevo y estéril, se depositaron 10 µl del producto de la PCR de secuenciación, se agregó 10 µl de X terminator y finalmente 45 µl de SAM. Se agitó la mezcla anterior y se incubó en termomixer por 30 min a 25 °C a 1300 rpm, se agitó nuevamente y se centrifugó por 2 min a 13000 rpm. Finalmente se transfirieron aproximadamente 40-50 µl del sobrenadante a un tubo nuevo, de lo anterior se toman 10 µl y se pasó a un nuevo tubo que fue enviado al proceso de secuenciación.

Las secuencias nucleotídicas fueron alineadas y comparadas con aquellas que están depositadas en la base de datos del GenBank utilizando los programas BioEdit Sequence Alignment Editor 5.0.6 y el CLUSTAL W 1.82. Además, las secuencias nucleotídicas que se obtuvieron en este estudio fueron depositadas en la base de datos GenBank. Los dendrogramas fueron construidos por un programa analítico (MEGA versión 4.0), utilizando el método de los pares vecinos. El modelo Jukes-Cantor y las distancias “p” fueron utilizadas para calcular las distancias genéticas por pares entre las secuencias. La confiabilidad de los agrupamientos fue evaluada por remuestreo (*bootstrapping*) con 1000 réplicas.

6.7 Potencial de formación de biopelícula y biomineralización de las especies obtenidas a partir de las biopelículas colectadas

Previo al desarrollo de cada experimento de formación de biopelículas, se tomó una asada de cada cepa bacteriana (Cuadro 2) para ser crecida en 10 mL de medio líquido LB (Luria Bertani, Miller) y fueron puestas a crecer con agitación moderada de 50 rpm (Cole Parmer Rocking platform, modelo 625E de EEUU) por alrededor de 18 a 20 horas en condiciones del cuarto de cultivo (Ambientales).

Cuadro 2. Aislados utilizados para ensayar los procesos de formación de biopelículas y bioprecipitación de cristales de carbonato de calcio.

Código LBI	Muestra		
	I	II	III
IS4	X		
IS5	X		
IIIS9b			X
IS3	X		
IIIS10			X
IS16	X		
IIIS17		X	
IIIS15a		X	
IIIS9a			X
IS12	X		
IIIS5			X
32			X
IIIS12		X	
IIIS3		X	
31			X
IIIS9		X	
IIIS2		X	
IIIS10		X	
IS8	X		
IIIS4			X
IIIS1		X	
IIIS9			X
IS2	X		
IS6	X		
21		X	
IIIS4		X	
27		X	
IS17a	X		
IS1	X		
IS17	X		

6.7.1. Ensayo de formación de la biopelícula por teñido con cristal violeta en placa

En una primera fase, de cada una de las 30 cepas a ser ensayadas y que previamente fueron crecidas en medio líquido LB por 18 a 20 horas, se tomaron 0.1 mL para ser transferido a placas de micro titulación de PVC (Becton Dickinson labware, Franklin Lakes, NJ, EEUU), y se siguió el protocolo propuesto por Djordjevic *et al.*, (2002) con algunas modificaciones para esta fase de trabajo, que se describen a continuación. Para cada cepa se hicieron 5 replicas y se utilizó como blanco la solución del medio de cultivo. Las placas fueron lavadas con alcohol al 70 % y secadas en condiciones de cámara de flujo vertical. Una vez inoculadas las placas con las suspensiones bacterianas y habiéndose hecho por duplicado para ser leídas sus absorbancias a las 24 horas y a las 48 horas en un espectrofotómetro Jenwall 6300 a 540 nm (Lab-Tech, instrumentation, EEUU) se pusieron a incubar a 30 °C (Incubadora Riossa, Meriequipos, México) . Transcurrido el tiempo de incubación tanto para 24 como para 48 horas, las placas fueron llevadas al lector de micro platos BIO-RAD modelo 550 (Meriequipos, BIO-RAD, México) y se determinó la absorbancia a 540 nm. Posteriormente se realizó el proceso de lavado (Figura 6A) de todas las bacterias que hayan quedado libres y por tanto no se hayan adherido a las paredes de la placa, por medio de tres lavados sucesivos con agua destilada y secándose en cámara de flujo por espacio de 30 minutos. Finalizados los treinta minutos se adicionaron 150 µL de cristal violeta al 0.1 % a cada pozo y se dejó reposar por 15 minutos para facilitar el teñido de las bacterias adheridas a las paredes de los pozos (Figura 6B). Se lavó nuevamente de 3 a 4 veces con agua destilada y se secó a temperatura ambiente por 15 minutos. Se adicionaron 150 µL de etanol absoluto para permitir el desteñido de las bacterias y se dejó en reposo por 15 minutos más, finalizando con la lectura nuevamente de la absorbancia a 540 nm de las micro placas (Lector de microplacas BIO-RAD 550, Meriequipos de México) utilizando en este caso como blanco el etanol absoluto (Figura 6C). Estos últimos valores de absorbancia, permitieron calcular de manera indirecta la cantidad o el número de bacterias que se adhirieron formando biopelículas. Todo lo anterior fue hecho con el propósito de contar con un tamizaje inicial de las 30 cepas (Cuadro 2) en estudio y determinar cuáles de ellas eran capaces de formar biopelículas en condiciones de la placa de PVC.

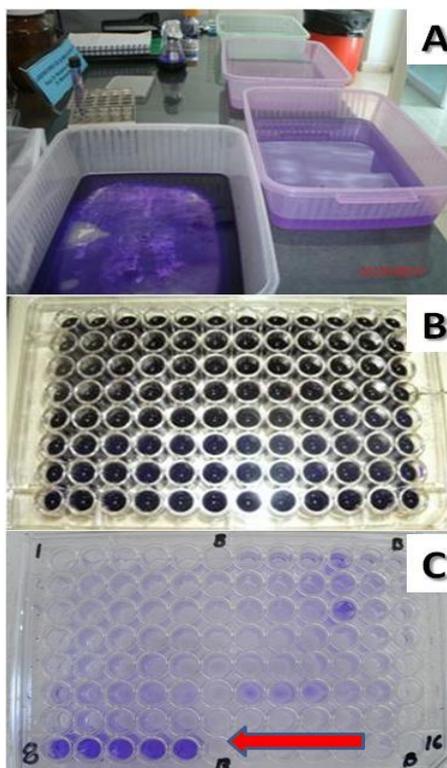


Figura 6. Proceso de lavado y teñido de las biopelículas. Charolas utilizadas para el proceso de lavado de las placas (A), Proceso de teñido con cristal violeta (B), Reposo de las muestras y (C) Evidencia de la formación de biopelícula señaladas con una flecha.

Considerando que de las 12 cepas que resultaron formar biopelículas, 3 de ellas son las que mejores resultados aportaron; se repitió todo el proceso de la fase 1 y tomando en cuenta los experimentos desarrollados por autores como: Boruki *et al.*, (2003); Peeters *et al.*, (2008); Wakimoto *et al.*, (2004) y Dzorjevick *et al.*, (2002). En esta fase se trabajó con las cepas IS16 y IIS10 (*Bacillus subtilis*), y la IIS15a (*Bacillus cereus*), que son las tres que mejor formaron biopelícula en la fase anterior, crecidas en medio LB suplementado con glucosa al 1.0 % tal y como lo recomiendan los autores antes mencionados. La glucosa fue filtrada para su esterilización con filtro millipore de 0.22 μm y posteriormente unida al medio LB (esterilizado en autoclave) con la glucosa en cámara de flujo laminar para su distribución en tubos, los cuales fueron finalmente inoculados para ser llevados a incubación con agitación.

6.7.2. Cinética del crecimiento microbiano

Para el desarrollo de esta prueba se pusieron a crecer las cepas IS16 (*Bacillus subtilis*), IIS15a (*Bacillus cereus*) y IIS10 (*Bacillus subtilis*) que fueron las que mejores resultados reportaron en cuanto a formación de biopelículas (del total de 12 que formaron las mejores biopelículas).

Para esto, se preparó medio LB estéril. Este medio fue distribuido a razón de 10 mL en tubos de ensayos estériles e inoculados con una azada de cada uno de los microorganismos inicialmente mencionados y puestos a crecer en condiciones de agitación a 50 rpm (Cole Parmer Rocking Platform, modelo 625E de EEUU) y temperatura ambiente, durante 20 horas. Este cultivo sirvió de base para la inoculación en erlenmeyer de 250 mL, y en los cuales se había puesto previamente 90 mL de medio LB estéril (razón de inoculación 1/10) para llevar a cabo todo el proceso cinético. Se tomó como blanco un matraz erlenmeyer conteniendo solo medio LB estéril (100 mL).

Tomando como referencia a Kova'Rova'Kovar y Egli (1998), para dar inicio con la corrida cinética se leyó la absorbancia a 540 nm para cada uno de los frascos erlenmeyer inoculados al tiempo cero y al mismo tiempo se tomó un volumen suficiente de cada uno para distribuir 100 µL de suspensión en placas de Petri preparadas con medio agar LB por triplicado. Estas placas una vez inoculadas, fueron puestas a incubar a 30 °C (Incubadora Riossa; EEUU) hasta por 16 a 20 horas cuando ya se observó un buen crecimiento que permitiese el conteo de las colonias formadas. Por otra parte, los erlenmeyer inoculados y el blanco fueron puestos en agitación a 150 rpm (Lab-Line, Lab-Tech instrumentation, EEUU) y a temperatura ambiente. Se tomó muestras de cada cultivo por cada dos horas y se repitió el proceso de leer absorbancia a 540 nm e inocular placas por triplicado con 100 µL de suspensión para cada tiempo y fueron puestas a incubar a 30 °C. Este proceso se mantuvo durante 24 horas continuas a la vez que se elaboraba la curva A 540 nm contra tiempo en horas.

6.8 Prueba de ureasa

Para el desarrollo de esta prueba se siguieron los protocolos recomendados por Hammes *et al.*, (2003a, b); Dick *et al.*, (2006); De Muynck *et al.*, (2008a, b) con adaptaciones a las condiciones propias del laboratorio de Biotecnología Ambiental de la Universidad Autónoma de Campeche, en donde se realizaron los experimentos. Para esto se prepararon 150 mL de un medio compuesto por 3g de medio de fermentación conteniendo rojo fenol como indicador, urea 3 g, 0.3g de fosfato potásico monobásica, 0.15 g de glucosa con 2. 4 g de agar-agar. Todos los componentes fueron disueltos en 125 mL de agua destilada salvo la urea y la glucosa que se disolvieron en los 25 mL de agua restantes. La urea y la glucosa disueltos en 25 mL de agua fueron esterilizadas por filtración (Filtros millipore de 0.22 µm) , mientras que los demás componentes disueltos en 125 mL de agua, fueron esterilizados en autoclave (AESA, MOD.CV 250) por 15 minutos a 120 ° C y 1 atm de presión. Ambos medios se juntaron en cámara de flujo laminar (Class IIA/B3 Biological Safety Cabinet) y fueron distribuidos en tubos microbiológicos a razón de 10 mL por cada tubo y puestos a solidificar formando cuñas. Se seleccionaron los 12 aislados mejores formadores de biopelículas para conducir la prueba de ureasa. Estos microorganismos fueron seleccionados a partir de los 30 inicialmente probados según el cuadro 2. Finalmente las cepas seleccionadas fueron puestas a incubar durante ocho días a 30 ° C, durante los cuales se verificaron periódicamente para ir observando el cambio de coloración como un indicativo de la liberación de la ureasa que

basifica el medio utilizado. Se utilizó como control negativo tubos en los cuales no se adicionó ningún microorganismo y como control positivo una cepa de *Paenibacillus* sp. comprobada como positiva en la producción de ureasa en el Laboratorio de Microbiología Ambiental de la UAC.

6.9. Ensayo de bioprecipitación de carbonatos

Se utilizó el medio LB suplementado con agar-agar, el cual fue preparado con adición de carbonato de calcio al 0.2 %, vaciado en placas de Petri y dejadas solidificar para su inoculación posterior con cada una de las cepas de los 12 aislados a los cuales se les había hecho prueba de ureasa previamente. Para cada cepa en estudio, se sembraron 5 replicas y se utilizó como control una placa conteniendo el medio con carbonato de calcio pero sin la adición de microorganismos. Una vez finalizada la siembra en placas, las mismas fueron puestas en incubación a 30° C durante un periodo de 22 días durante los cuales se realizaron verificaciones constantes al microscopio de luz (Nikon Eclipse E200, Japón) con el objetivo 10 X y se tomaron fotografías de los cristales (Cámara Nikon DS-Fi1 y equipo de captura de imágenes Nikon Digital Sight, EEUU) formados a través del tiempo a fin de documentar su proceso de formación para cada una de las cepas con el transcurso del tiempo, siguiendo una adaptación del proceso de precipitación de cristales propuesto por Laiz *et al.*, (2009).

Finalizado el periodo de incubación se dió inicio al proceso de cosecha de los cristales para cada una de las cepas en estudio. Para esto se retiraron los cultivos de la incubadora y con una espátula metálica se hicieron cortes al agar conteniendo los microorganismos y los cristales para ser llevados a frascos Erlenmeyer tal y como se muestra en las figuras 7A y B. Una vez trasladado el agar de todas las placas inoculadas a los erlenmeyer, se adicionó suficiente agua destilada previamente calentada en horno de microondas y nuevamente se puso en microondas hasta lograr la fundición completa del agar. Una vez fundido el agar, el frasco erlenmeyer se retiró del microondas y fue puesto en reposo para precipitar los carbonatos en excesos junto a los cristales durante un tiempo no menor de 15 minutos.

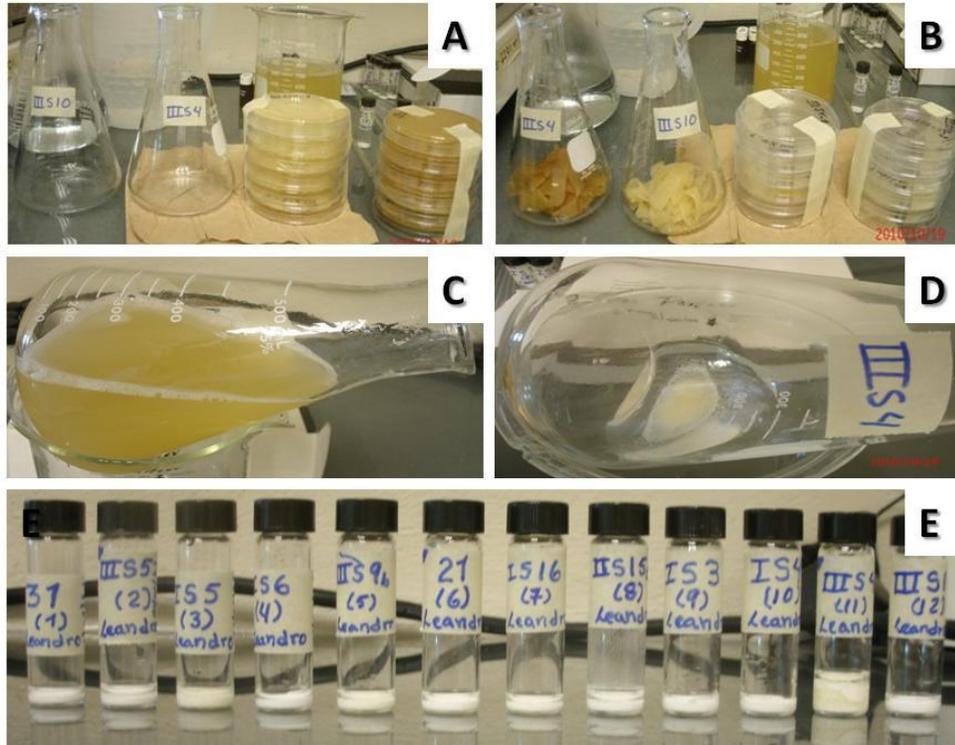


Figura 7. Proceso de obtención de cristales: Inicio del proceso de cosecha de cristales (A), Transferencia a Erlenmeyer (B), Reposo del agar fundido y precipitación (C), Lavado de cristales (D), Cristales listos para análisis posteriores (E).

Transcurrido este tiempo, se retiró el sobrenadante del frasco erlenmeyer y se adicionó agua destilada limpia y fresca para iniciar un proceso de tres lavados con 15 minutos de precipitación en cada caso (Figs. 7C y D). Finalizado el proceso de lavado, los cristales y el exceso de carbonato fue retirado del erlenmeyer por medio de pipetas Pasteur y envasado en viales (Proceso desarrollado en el Laboratorio de Biotecnología Ambiental de la Universidad Autónoma de Campeche). Finalmente fueron trasladados para su posterior análisis por difracción de rayos X y microscopía electrónica de barrido, los cuales fueron desarrollados en calidad de servicios externos por los laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY de Merida, Yucatán, México).

7. RESULTADOS

Se realizó un muestreo en abril del 2009 en sitios externos al edificio. Para esto se tomaron muestras en tres diferentes puntos correspondientes a los muros y cimientos perimetrales de acceso al Castillo (puntos I y II, Figura 2C y D) y en un monumento en el patio del mismo (punto III, Figura 2 A y B) en los cuales fue posible observar diferentes tipos de biopelículas como las mostradas en las Figuras 8 A, B, C, E y F.

El desarrollo de este trabajo ha permitido obtener los siguientes resultados en correspondencia con los objetivos que fueron propuestos.

7.1 Zona de muestreos

Diversos autores (Delille, 1995; Jørgensen y Bak, 1991; Parkes *et al.*, 1994) han caracterizado comunidades microbianas utilizando métodos basados en cultivo a pesar de que como se mencionó anteriormente, se han señalado algunas limitaciones a su uso (Laiz *et al* 2001; Amann *et al.*, 1995). En este trabajo diversas comunidades microbianas fueron localizadas. De esta forma, en el punto I se localizaron diversos tipos de biopelículas como las mostradas en las Figuras 8A y 8B, en el punto II se localizaron además de biopelículas como las ya mencionadas para el punto I, diversas zonas biomineralizadas como la mostrada en la Figura 8C, en las cuales si se levantaba la capa de biominerales era posible observar la presencia de capas de microorganismos formando biopelículas, en este punto se muestreó superficialmente y por debajo de la zona biomineralizada. Todas las muestras fueron tomadas entre los días 16 y 17 de abril del 2009. Un tercer punto (III, Figura 8D-E) ubicado en un monumento del patio del Castillo (Figura 8D), en el cual se observó deterioro de la roca (Figura 8E), grandes desprendimientos de la misma y zonas fracturadas se pueden ver en la Figura 8F. El muestreo fue realizado en las zonas erosionadas del monumento, zonas de fracturas y desprendimientos de roca.

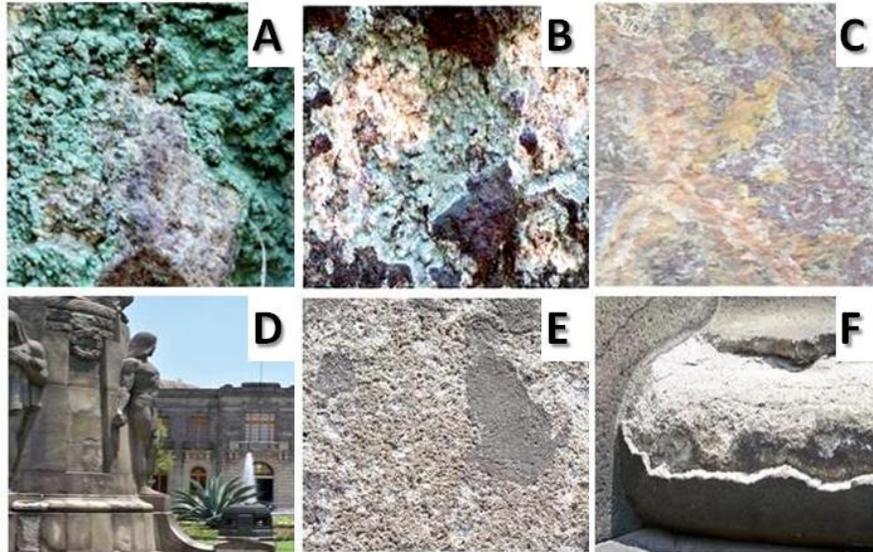


Figura 8. Muestras colectadas: A y B) Biopelículas del punto I; C) Zona biomineralizada del punto II; D) Monumento del patio del Castillo; E) Zona erosionada de la roca del monumento y F). Zona fracturada y erosionada de la roca del punto III.

En el presente estudio se aplicó un análisis combinado entre los métodos tradicionales de cultivo y métodos moleculares (análisis de secuencia y haplotipos moleculares) en la caracterización de las comunidades microbianas asociadas a superficies rocosas del Castillo de Chapultepec.

7.2 Identificación de hongos filamentosos

Los aislados puros (Figura 9), luego de haber sido crecidos en medio PDA (Agar Dextrosa y papa), fueron puestos en incubación por 5 a 7 días a 30 °C a diferentes pH. Se analizaron sus características morfológicas al microscopio de luz a 40 X para visualizar el tipo de espora que producían. Al mismo tiempo se colectó toda la información correspondiente al crecimiento de cada aislado en cuanto a largo de la conidia, ancho de la conidia, color en placa, tiempo en que aparece la primera conidia, así como su crecimiento para cada uno de los valores de pH que se analizaron. Los resultados se muestran en el cuadro 3.

Los resultados de la observación de la espora al microscopio de luz y su contraste con lo reportado en la literatura (Barnet y Hunter, 1998) condujeron a una primera aproximación al género del que se trataba. Algunos de los aislados de hongos filamentosos de este estudio fueron identificados como: *Trichoderma*, *Alternaria*, *Mucor*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Epicoccum*, *Penicillium*, entre otros.

Cuadro 3. Características morfológicas de los aislados de hongos filamentosos identificados

Cepa	Característica							
	Longitud de espora	Ancho de espora	Longitud / Ancho	Crecimiento en PDA 72h, 29°C, pH 5,6 (mm)	Visualiza primera espora (h) 29°C, pH 5,6	Color de esporas, 29°C, pH 5,6	Color del reverso del plato PDA, 29°C, pH 5,6	Margen de la colonia, 48h, 29°C, pH 5,6 (mm)
II4	17.46 ± 2.38	4.2 ± 0.46	Elipsoide	23.25	120	Blanco	Beige	13.25
T11	21.02 ± 3.18	5.19 ± 0.54	Elipsoide	21.5	120	Blanco	Beige	11
T23	29.95 ± 4.93	7.32 ± 0.79	Elipsoide	9.75	120	Blanco	Beige	4.75
III1	19.02 ± 2.79	5.78 ± 0.89	Elipsoide	13.5	120	Blanco	Beige	7.5
I10	34.72 ± 3.24	7.11 ± 2.05	Elipsoide	16.5	144	Blanco	Beige	8
T12	23.12 ± 1.64	6.79 ± 0.56	Elipsoide	21	120	Blanco	Beige	11
II1	20.02 ± 6.72	5.89 ± 1.25	Elipsoide	20	144	Blanco	Beige	10.75
I2	19.43 ± 2.24	4.75 ± 0.46	Elipsoide	22	96	Blanco	Beige	13.25
I13	25.21 ± 4.66	7.35 ± 1.49	Elipsoide	6	168	Blanco	Beige	3.25
I7	22.36 ± 2.03	4.74 ± 1.30	Elipsoide	14	192	Blanco	Beige	8
I9	20.58 ± 4.34	5.84 ± 0.62	Elipsoide	7	144	Gris	Beige	3.75
III2	6.18 ± 0.78	3.72 ± 0.67	Elipsoide	7	144	Gris	Beige	3.75
III3	8.09 ± 3.25	4.08 ± 0.57	Elipsoide	3.75	120	Blanco	Verde oscuro	2
III5	8.39 ± 1.18	4.64 ± 0.99	Elipsoide	3.5	120	Verde	Verde oscuro	1.75
II2	4.55 ± 0.37	4.55 ± 0.37	Esférica	21	96	Verde oscuro	Beige	11
II8	4.24 ± 0.36	4.29 ± 0.39	Esférica	>P	96	Verde oscuro	Beige	16.75
T21	4.38 ± 0.48	4.38 ± 0.48	Esférica	>P	72	Verde claro	Beige	34
I1	37.82 ± 13.94	11.1 ± 1.96	Elipsoide	14	168	Gris	Gris oscuro	9
III10	33.03 ± 6.39	11.77 ± 1.43	Elipsoide	13	96	Verde oscuro	Gris Oscuro	7.75
III12	9.29 ± 0.32	5.30 ± 0.55	Elipsoide	>P	96	Gris oscuro	Verde claro	22.25
II6	9.87 ± 0.82	5.29 ± 0.27	Elipsoide	32.5	96	Gris oscuro	Verde claro	21.75
III13	10.56 ± 1.03	5.26 ± 0.34	Elipsoide	30.25	96	Gris oscuro	Verde claro	21.25
III11	2.87 ± 0.24	2.87 ± 0.24	Esférica	17	120	Traslucida	Blanco	9.5
T22	5.44 ± 0.60	5.44 ± 0.60	Esférica	>P	96	Negro	Verde claro	12.25
III9	5.11 ± 1.08	5.11 ± 1.08	Esférica	7.5	96	Amarilla	Rojo oscuro	5
III6	3.41 ± 0.33	3.41 ± 0.33	Esférica	5	96	Verde oscuro	Verde claro	2.75
I11	9.35 ± 2.97	2.92 ± 0.70	Elipsoide	3.5	240	Gris	Beige	2.5
III16	19.60 ± 1.12	4.33 ± 0.20	Elipsoide	10.5	240	Blanco	Beige	6

Características morfológicas de los aislados de hongos filamentosos identificados (Continuación).

Cepa	Característica (mm)							
	Crec pH 3.6, 24h	Crec pH 3.6, 48h	Crec pH 3.6, 72h	Crec pH 3.6, 96h	Crec pH 5.6, 24h	Crec pH 5.6, 48h	Crec pH 5.6, 72h	Crec pH 5.6, 96h
II4	2	8	14.5	21	4	13.25	23.25	31.75
T11	1	6	12	17	3	11	21.5	29
T23	1	3.75	7	11	1	4.75	9.75	15
III1	0.5	5.75	11.5	18	1.5	7.5	13.5	22.25
I10	1.75	7	13.5	19.5	1.75	8	16.5	21.25
T12	1	6.5	12.5	18.5	2.5	11	21	30
II1	2.25	7.25	13	18.5	3	10.75	20	28.5
I2	2.5	9.75	14.75	20.25	4	13.25	22	32
I13	0.75	2.5	6	11	0.5	3.25	6	10.5
I7	0.75	6	12.25	19.75	2.75	8	14	20.5
I9	1	5.5	8.75	13.5	1	3.75	7	10.5
III2	0.5	2.5	4.5	7.25	0.5	2	4.25	6
III3	0.75	2	4	6	0.5	2	3.75	6.5
III5	0.5	1.25	2	3.5	0.5	1.75	3.5	5.5
II2	3	10.5	20.5	>P	2.5	11	21	>P
II8	3.5	19.25	>P	>P	2.5	16.75	>P	>P
T21	10.5	36	>P	>P	10	34	>P	>P
I1	1.75	7	12.75	18	2.5	9	14	20
III10	0.5	5	8.5	13.25	1	7.75	13	19
III12	5	17.5	26	>P	6.5	22.25	>P	>P
II6	7	17.25	26	>P	8.5	21.75	32.5	>P
III13	7	18	22	>P	7.5	21.25	30.25	>P
III11	1.5	8.5	15.5	19.25	1.5	9.5	17	24.75
T22	4	7.5	>P	>P	4	12.25	>P	>P
III9	0.75	4	5.5	9.5	0.75	5	7.5	10
III6	0.5	3	5	6	0.5	2.75	5	8.5
I11	0.5	0.5	0.75	2.75	0.5	2.5	3.5	6.5
III16	1	4.75	9	15	0.5	6	10.5	16.5

Características morfológicas de los aislados de hongos filamentosos identificados (Conclusión).

Cepa	Característica (mm)							
	pH 7.6, 24h	pH 7.6, 48h	pH 7.6, 72h	pH 7.6, 96h	pH 9.6, 24h	pH 9.6, 48h	pH 9.6, 72h	pH 9.6, 96h
II4	5	13.5	23.5	31.5	5	14	22.75	31.5
T11	3	12	19.5	29.5	2	12	20	29.5
T23	1	4.5	9.5	15.5	1	5	8.5	15
III1	2	9.25	16.5	22.25	1.5	9.25	15	22.25
I10	3.75	10.5	16.5	21.5	4	11.5	17	22.75
T12	3.25	11.5	21	31.5	3.25	12.5	21	30.5
II1	3.25	11.5	21	28.5	3	11	19.5	26.75
I2	4.5	14.25	22	32.5	5	13.75	21.5	31
I13	2	5.5	9.25	12.75	1.5	6	10	16.75
I7	4	11.5	17.25	26.5	3.5	10.5	18.5	23.5
I9	1.5	6	8.75	12.75	1	6.5	8.5	12.75
III2	0.75	3	5.5	7	1.75	3	5	6
III3	0.5	2.5	4.25	6.5	0.5	1.5	3.5	5.5
III5	1.5	2.75	5.5	6	0.75	1.5	2.5	4.5
II2	2.75	8.75	19.25	29.25	2.5	8.5	26.5	>P
II8	2.5	15.5	27.5	>P	3	16	32.25	>P
T21	8.5	27.25	>P	>P	7	24.5	>P	>P
I1	3.25	8.75	13.5	19.5	3	7	12.25	17.75
III10	2.5	8.75	13.5	20.25	2	6.5	12	18.5
III12	5.75	20.25	>P	>P	5.5	18.5	33.5	>P
II6	8.5	20.75	21.25	>P	8	19.75	29.5	>P
III13	6.5	19.25	31	>P	6.5	20.25	30.25	>P
III11	1	9	16	24.25	1	8	12.5	23.5
T22	4	12.75	>P	>P	4	11	>P	>P
III9	0.5	5	8	11.5	1	5.5	7	10
III6	0.75	2.25	5	8.75	1.5	3.75	6	8.75
I11	0.5	2	3.75	6.75	0.5	2	3.5	6.5
III16	1.5	7	12	17	2	5.5	11	15

Crec Crecimiento. >P, Crecimiento mayor que el diámetro de la placa.

El análisis del cuadro 3, permite ver que la mayoría de géneros aislados crecen bien en medio enriquecido PDA a pH entre 5.6 y 9.6 y 30 °C, sin mayores diferencias en cuanto a crecimiento a las 96 horas de incubación (Figuras 10, 46 y 47). Los aislados pertenecientes al género *Cladosporium* parecen crecer un poco mejor a 7.6 de pH e iguales condiciones de incubación. Algunos géneros como *Trichoderma*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Epicoccum* y *Pestalotiopsis*, mostraron muy buen crecimiento en PDA para todos los valores de pH analizados incluyendo 3.6. Para estos últimos géneros, inclusive a las 72 horas de incubación y a todos los valores de pH ya mostraban un máximo de crecimiento en placa de PDA. En la mayoría de los casos se observaron esporas elipsoides, con diversas tonalidades de coloración tanto en esporas como en crecimiento en placa Petri, lo cual es la razón de las diversas coloraciones que se observan en las biopelículas muestreadas (Figuras 8 A, B, C, E y F). Es importante destacar que géneros como *Trichoderma* solo se aislaron del punto II muestreado, o sea asociadas al muro perimetral y a biopelículas en las cuales se observó biomineralización (Figura 8C), mientras que *Alternaria* se detectó en biopelículas del punto I (muro perimetral, Figura 8 A y B) y en el punto III (monumento en el patio, Figura 8D).

Los aislados de hongos filamentosos que se obtuvieron fueron llevados a micro tubos y posteriormente enviados al congelador a -70 ° C para su posterior extracción de ADN y desarrollo de los trabajos genómicos para determinar la especie a la que corresponde cada uno de ellos y poder comparar con la identificación hecha a nivel de género por medio de las características morfológicas. Hasta aquí y previo a la identificación por medio de secuenciación, se llegó a conocer que en la biopelícula coexisten géneros como: *Fusarium*, *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Alternaria*, *Mucor*, *Aspergillus*, y *Penicillium*, *Stemphylium*, *Epicoccum* entre otros (Figura 9). Un mayor detalle de cada uno de los aislados puede verse en el apéndice B, Figuras 42 a la 45.

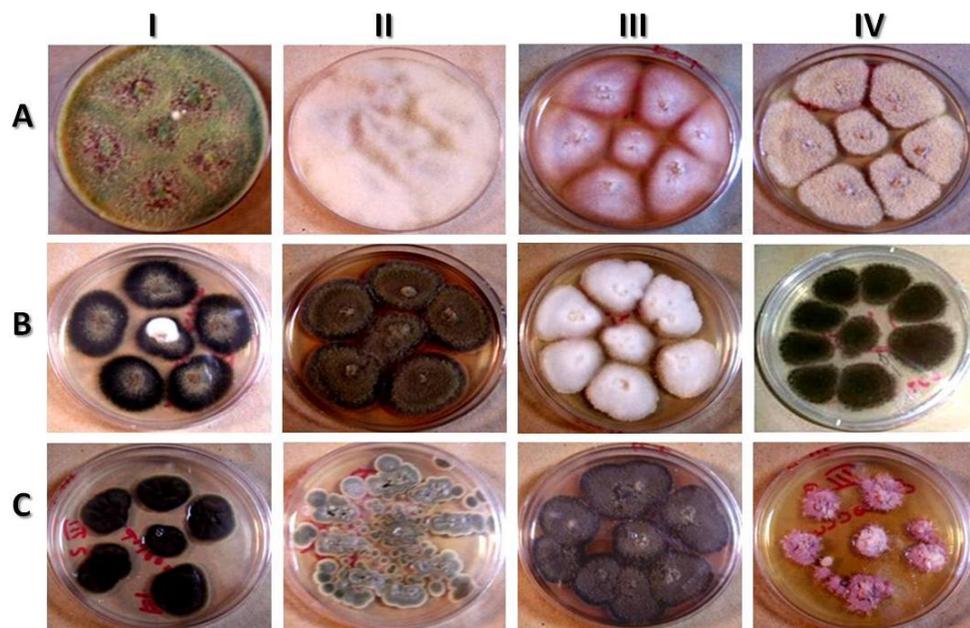
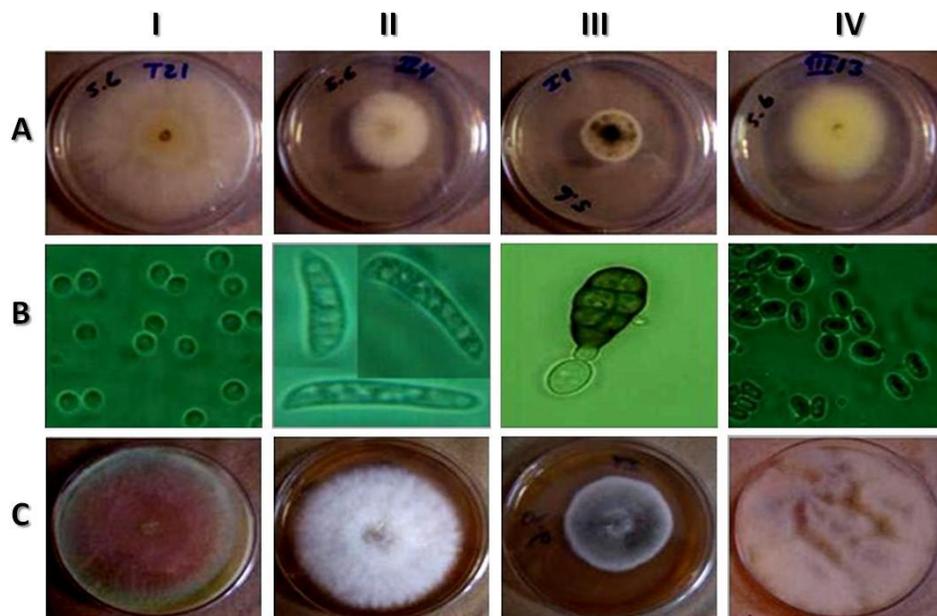


Figura 9. Muestra representativa de los diferentes géneros aislados. AI. *Trichoderma harzianum*, AII. *Mucor hiemalis*, AIII. *Fusarium solani*, AIV. *Fusarium* sp., BI. *Alternaria tenuissima*, BII. *Alternaria* sp., BIII. *Aspergillus fumigatus*, BIV. *Aspergillus niger*, CI. *Cladosporium* sp., CII. *Penicillium* sp., CIII. *Stemphylium* sp., CIV. *Epicoccum* sp.

La abundante diversidad encontrada en las diferentes biopelículas del sitio asociados al Castillo de Chapultepec, nos llevó a obtener alrededor de 10 géneros distintos de hongos filamentosos. Del género *Trichoderma* se encontraron 3 aislados, al igual que del género *Mucor*. *Fusarium* por su parte, arrojó 10 diferentes aislados, *Cladosporium* 3, *Aspergillus* 2 y *Stemphylium* con más de 4 aislados, fue el género con mayor número de aislados. De otros géneros como *Penicillium* y *Epicoccum* se obtuvo solo 1 aislado.

El crecimiento en PDA a diferentes pH (3.6, 5.6, 7.6 y 9.6), así como la conidia formada durante el tiempo en el cual se determinaron los parámetros recogidos en el Cuadro 3, se muestran a continuación (Figura 10) y se amplía la información en el apéndice B, Figuras 46 y 47



7.3 Identificación de levaduras

Para el aislamiento de levaduras, se siguió un procedimiento similar al seguido previamente con hongos filamentosos, una vez que se obtuvieron cultivos puros de las

mismas mediante el cultivo en placa Petri utilizando medio PDA e incubando a 30 °C; se observaron las muestras al microscopio de luz y debido al tamaño observado, a la coloración en placa y a peculiaridades propias de su crecimiento se sugirió que los seis aislados podrían tratarse de levaduras. Aplicando el estuche comercial API 20 C AUX (Biomerieux, Francia) diseñado para la identificación de levaduras, obteniéndose los siguientes perfiles de consumo de azúcares (Cuadro 4). Debido a que actualmente en el laboratorio no se tenía acceso al software específico para la interpretación de los resultados y que el número de aislados eran pocos (seis en total), se recurrió a la bibliografía especializada de identificación de levaduras por pruebas bioquímicas (Barnet *et al.*, 2000). Como producto de consultar esta última referencia y con los resultados de la prueba API se llegó a la conclusión de que se encontraron *Aureobasidium pullulans*, *Rhodotorula glutinis* y *Rhodotorula mucilaginosa*.

Cuadro 4. Resultados de las pruebas bioquímicas para las levaduras aisladas

Cepa	G L U	G L Y	2 K G	A R A	X Y L	A D O	X L T	G A L	I N O	S O R	M D G	N A G	C E L	L A C	M A L	S A C	T R E	M L Z	R A F
11	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
15	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
16	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
17	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
18	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
19	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+

Nomenclatura:GLU: D-GLUcosa; GLY; glycerol; 2KG; 2-Keto-Gluconato-calcico; ARA:L-ARAbinosa; XYL:D-XYLosa; ADO:ADOnitol; XLT:XyLiTol; GAL:D-GALactosa; INO:INOsitol; SOR:D-SORbitol; MDG:Metl- α D-Glucopiranosida; NAG:N-Acetil-Glucosamina; CEL:D-CELOBiosida; LAC:D-Lactosa (origen bovina); MAL:D-MALtosa; SAC:D-SACarosa; TRE:D-TREhalosa; MLZ:D-MeLeZitosa; RAF:D-RAFinosa. Nota importante: Los resultados anteriores se analizaron con lo reportado por Barnett *et al.* (2000).

En función de los resultados de las pruebas bioquímicas se clasifico a las levaduras como sigue: Cepa 11 como *Aureobasidium pullulans*, a las cepas 15 a 17 como *Rhodotorula glutinis* y a las cepas 18 y 19 como *Rhodotorula mucilaginosa* (Barnet *et al.*, 2000). Estas cepas se enviaron a preservación en glicerol al 86 % a -70 °C. Se determinó que las levaduras del género *Rhodotorulas* se diferencian de las levaduras *Aureobasidium pullulan*, tanto en su coloración como en su forma. *Rhodotorulas* tienden a ser células esféricas o ligeramente elipsoides, con crecimiento abundante en placa Petri y de color rosado, *Aureobasidium* produce células marcadamente elipsoides, con células alargadas y de crecimiento en placa Petri abundante y de color blanco.

Las levaduras identificadas por medio del API 20C AUX (Biomeriux, Fancia) fueron puestas a crecer en medio RAT e incubados a 30 °C hasta por ocho días con vistas a determinar si las mismas formaban o no pseudohifas en el tiempo y de este modo contribuir a su identificación morfológica y bioquímica. Los resultados muestran que a los ocho días de incubación solamente se observó la formación de pseudohifas para la cepa 11 de *Aureobasidium pullulans*, las demás cepas no forman esta estructura a los ocho días (Figura 11).

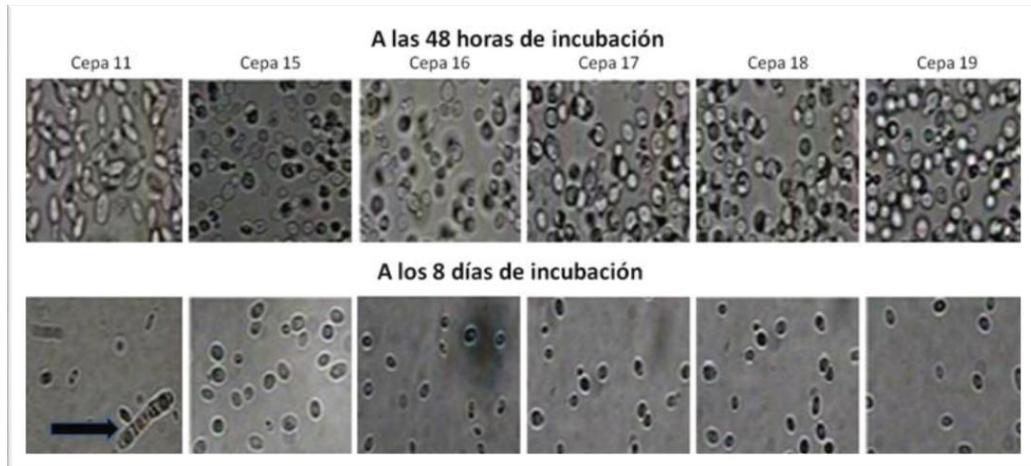


Figura 11. Cultivos de levaduras puestas a crecer en medio RAT y observados al microscopio a las 48 horas y hasta 8 días después de estar en incubación. La flecha indica la formación de pseudohifas.

Con vistas a analizar la formación de pseudohifas por parte de estas levaduras aisladas y así contribuir a su identificación, se llevó a cabo la prueba RAT. Los resultados mostrados mediante la figura 11, permiten analizar que los aislados permanecen sin mayores alteraciones hasta las 48 horas. Debido a que el medio RAT es un medio pobre en nutrientes, después de 48 horas se observa la disminución del número de células por campo en el microscopio, lo cual puede deberse entre otras cosas al estrés al que están sometidas como producto de la falta de nutrientes. Trascorridas las 72 horas, el estrés es notorio pero no provoca cambios en las cepas 15 a 19, sin embargo, a los ocho días de incubación solamente el aislado identificado como *Aureobasidium pullulans* (cepa 11) presentó la formación de pseudohifas en correspondencia con lo planteado en la literatura (Barnet *et al.*, 2000)

7.4 Identificación de bacterias

El aislamiento se realizó como se describió previamente en la sección de métodos y aquellas colonias que se sospechaba se trataban de bacterias, fueron resembradas en placas Petri conteniendo medio LB (Luria Bertany) e incubadas a 30 °C por 18 a 24 horas,

de esta forma se obtuvieron alrededor de 70 aislados bacterianos. Los cultivos crecidos fueron observados al microscopio de luz a 100 X con aceite de inmersión para verificar si se trataba de bacterias de acuerdo con la morfología observada. Estos mismos cultivos fueron sometidos a pruebas de tinción Gram tal y como se muestra en las Figuras 12, 48 y 49, observándose cultivos mayormente Gram positivos y Gram variables. Con vistas a identificar los aislados bacterianos y dado que los API disponibles son generalmente para aislados Gram negativos, se decidió que esta identificación se haría por vía molecular utilizando los iniciadores 16 S y Com, lo cual se detalla más adelante. De los 70 aislados, aquellos que fueron amplificados con los iniciadores utilizados, fueron identificados directamente por análisis de diferentes regiones de su secuencia 16S ribosomal. En este caso se logró identificar diferentes géneros como: *Bacillus*, *Kokuria*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Brevundimonas*, *Microbacterium*, *Oceanobacillus*, y *Stenotrophomonas*, entre otros.

En general los resultados mostraron una tinción Gram variable como se podrá apreciar en la Figura correspondiente a los aislados del punto III siguiente.

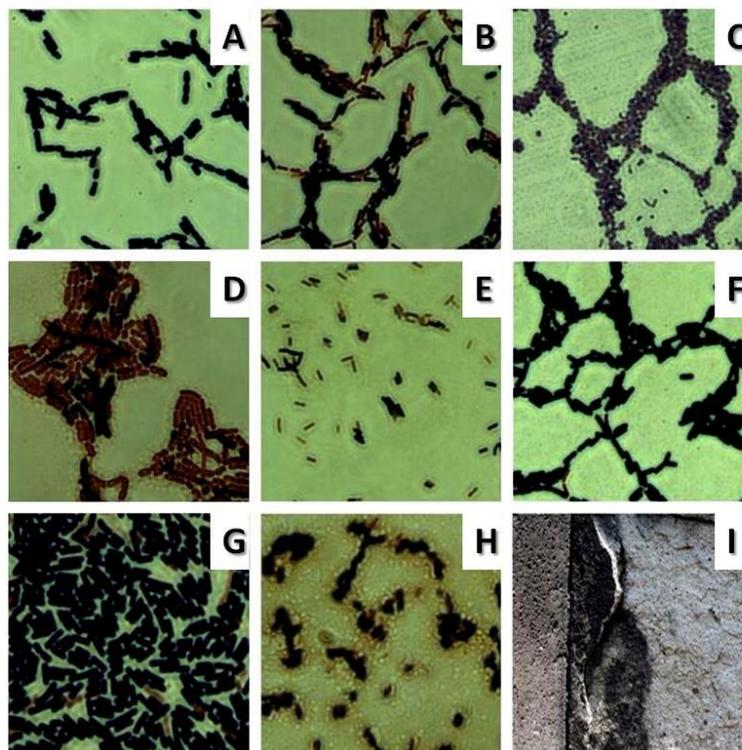


Figura 12. Aislados obtenidos del punto III, en el cual puede observarse la Gram variabilidad presente en los mismos. (A) IIS9a *Bacillus cereus*; (B, F y G) IIS5, 31 y 31 *Bacillus simplex*; (C) IIS9 *Arthrobacter* sp.; (D) IIS4 *Bacillus megaterium*; (E, H) IIS10, IIS9b: *Bacillus subtilis*; (I) Biopelícula encontrada en el punto III

Se puede observar en la Figura anterior, la presencia de bacterias fundamentalmente Gram positivas. Sin embargo en las Figuras 12B, 12 C y 12D es posible observar la Gram

variabilidad de los cultivos. Este fenómeno fue observado en los diversos aislados obtenidos para los diferentes puntos muestreados I, II y III (Apéndice B, Figuras 48 y 49)

7.5 Identidad molecular de microorganismos aislados e identificados

7.5.1. Identidad molecular de hongos en general (Filamentosos y levaduriformes)

La extracción de ADN para los hongos filamentosos en este trabajo se llevó a cabo utilizando los métodos propuestos por Rojas-Herrera *et al.*, (2008) y Raeder y Broda, (1985). El primer método no generó buenos resultados para el caso de los hongos oscuros como *Aspergillus niger* y *Stemphylium*. Para estos últimos casos y previo a comenzar el proceso de amplificación (PCR) fue necesario realizar la purificación del ADN mediante una serie de dos a tres lavados con alcohol absoluto a 4 °C. En general, los resultados obtenidos se muestran en la Figura 13 (método Fenol / Cloroformo), observándose la presencia de ADN para la mayoría de los casos. Concluida la extracción del ADN, se procedió al proceso de amplificación utilizando los iniciadores para la región 26S (NL1 y NL4). Un ejemplo de los resultados alcanzados se muestra en la Figura 14, en donde es posible ver que luego de probar diversas condiciones de reacción y la que mejor resultados fue la que se reporta en la parte inferior del gel de la Figura 14. En general para todos los procesos de amplificación para hongos filamentosos fue necesaria la adición de BSA y temperaturas de amplificación cercanas o iguales 58°C. Como se puede ver del análisis del gel, en la parte superior no se observa ninguna amplificación de los productos de la PCR anidada (gel de la parte superior).

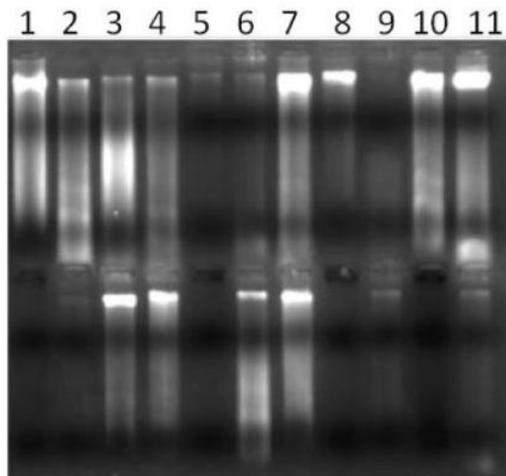


Figura 13. ADN de hongos filamentosos extraídos con Fenol/cloroformo, corridos en gel de agarosa al 1.5 % durante 45 minutos a 90 V, con 3 μ L de Cyber y 5 μ L de ADN. Carriles superiores: 1.III6, 2.III8, 3.I1, 4.II1, 5.II8, 6.T23, 7.I6, 8.III12, 9.I12, 10.I4 y 11.III4. Carriles inferiores: 1.T31, 2.I16, 3.III3, 4.I3, 5.T15, 6.III1, 7.II6, 8.T17, 9.II2, 10.T24, 11.II2.

En todos los casos para los carriles superiores se puede ver la presencia de ADN en el gel, aunque en algunos casos este es menor, coincidiendo con aquellos hongos en los cuales resultó más difícil romper la estructura del hongo o en los casos en los cuales los hongos eran de color muy oscuro como es el caso de los *Aspergillus niger* y *Stemphylium* cuya presencia de ADN no pudo verificarse en el gel según los carriles inferiores. Para los casos en los cuales se obtuvo ADN, se cuantifico el mismo, obteniéndose cantidades variables que oscilaban entre 80 y más de 200 ng.

A continuación se desarrolló el proceso de amplificación del ADN antes extraído de hongos filamentosos utilizando los iniciadores 26S (NL1 (5'GCATTCAATAAGCGGAGGAAAAG3') y NL4 (5' GGTCCGTGTTTCAAGACGG 3') (White *et al*, 1990)), aquí se muestran solo algunos de los resultados obtenidos a fin de mostrar ejemplos del proceso realizado.

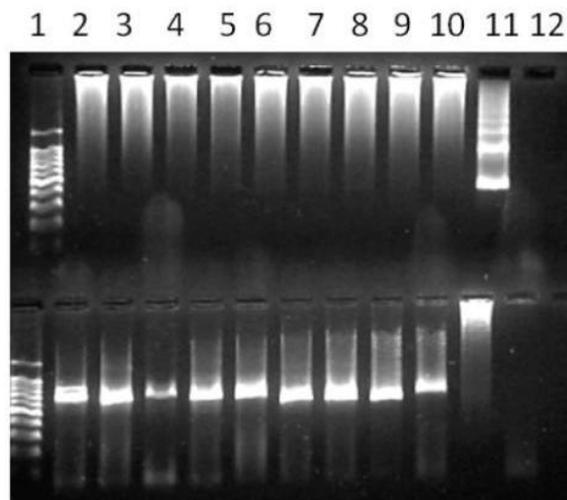


Figura 14. Gel de agarosa al 1.5% mostrando el ADN de una amplificación previa (carriles superiores) y producto de amplificación por PCR (carriles inferiores) de la región 26S del ADNr de los hongos filamentosos. Carriles superiores: 1. MM de 100 bp, 2.I14, 3.I15, 4.III15, 5.T17, 6.T24, 7.T31, I16, 9.I12, 10.T15, 11.Testigo+, 12.Testigo -. Con 3 μ L de producto de PCR previamente obtenido. Carriles inferiores: La misma ubicación para el marcador molecular, los aislados y los testigos, salvo que en este caso se trabajó con ADN puro.

Como puede apreciarse en el gel anterior, cuando se trabajó en condiciones de PCR anidada, no se obtuvo ninguna amplificación, probablemente debido a degradación del ADN por el tiempo transcurrido desde la amplificación a esa fecha. Cuando se trabaja con ADN puro (carriles inferiores), si se observa la amplificación de todos los aislados de estudio.

En el caso de las levaduras y bacterias, la extracción del ADN fue llevada a cabo por el método del Fenol / Cloroformo (Raeder y Broda, 1985). Las Figuras 15 A y B, muestran los geles para el ADN de levaduras y la amplificación del mismo respectivamente. La Figura 15A nos muestra la aplicación del método Fenol / Cloroformo, determinando que la cantidad inicial de muestra (cercana a los 0.5 g) y el tiempo de congelación de la misma (15 minutos en nitrógeno líquido ó una noche a -70°C), influyen en la calidad del ADN que se obtenga. La Figura 15 B nos muestra la amplificación de las levaduras con BSA y puede verse que con una T_m a 60°C y las condiciones de reacción similares a las utilizadas para hongos filamentosos, se obtiene muy buena amplificación para cinco de los aislados correspondientes a levaduras del tipo *Rhodotorula*, no así para la cepa 11 (*Aureobasidium pullulans*). Esta última no mostró ninguna amplificación a estas mismas condiciones. No obstante una nueva corrida de PCR variando únicamente la T_m a 58°C (Gel no mostrado aquí), reportó muy buenos resultados en cuanto a amplificar a la cepa 11.

El ADN extraído de las levaduras por el método Fenol/cloroformo arrojó los siguientes resultados (Figura 15):

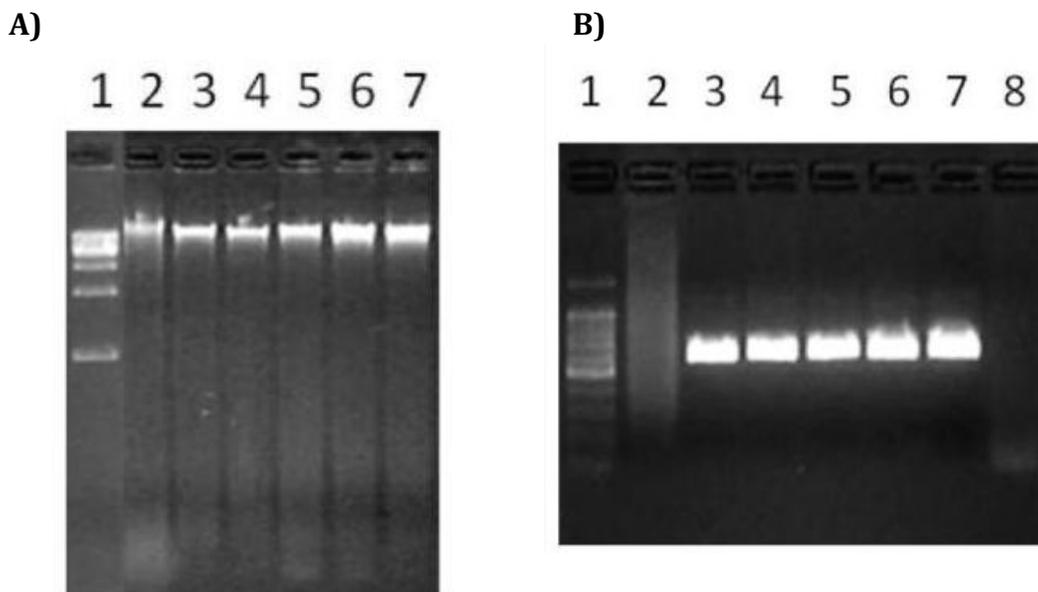


Figura 15. (A) Resultados del ADNg en gel de agarosa al 1.5 % de las levaduras, extraídas con protocolo Fenol / Cloroformo y (B) amplificación por PCR con BSA y 26S de levaduras. 1. MM de 100 bp, 2. Cepa 11, 3. Cepa 15, 4. Cepa 16, 5. Cepa 17, 6. Cepa 18, 7. Cepa 19, 8. Testigo -.

Para todos los casos de las levaduras en estudio, fue posible obtener buena cantidad y calidad de ADN por medio del método utilizado, la cuantificación arrojó cantidades superiores a los 400 ng de ADN para cada caso.

7.5.2. Análisis de haplotipos *rep*-PCR y *eric*-PCR

Con el objetivo de conocer las diferencias en cuanto a haplotipos en los diferentes aislados se procedió a amplificarlos con *rep*-PCR y *eric*-PCR. En el caso de las levaduras se obtuvieron los resultados que se muestran en las Figuras 16 A y B.

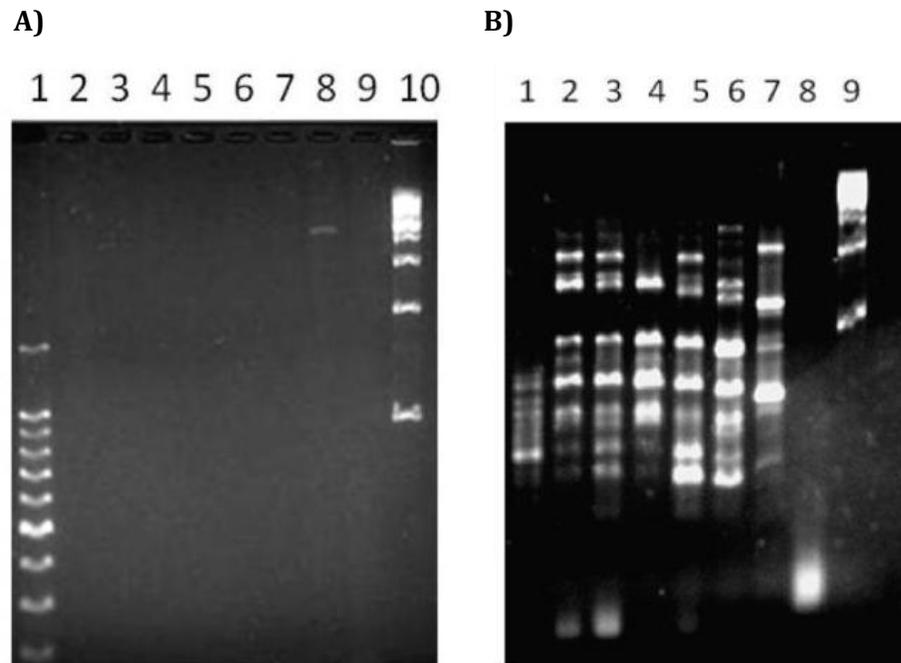


Figura 16. *rep*-PCR y *eric*-PCR con BSA de los aislados de levaduras. Las condiciones de amplificación son iguales a las señaladas en la metodología con la excepción de que la TM fue de 65°C. Abreviaciones. A) Carriles:1. MM de 100 bp; 2. Cepa 11; 3. Cepa 15; 4. Cepa 16; 5. Cepa 17; 6. Cepa 18; 7. Cepa 19; 8. Testigo positivo; 9. Testigo negativo; 10. MM de 1 kbp. B) 1 es MM de 100 bp, 2: Cepa 15, 3: Cepa 16, 4: Cepa 17, 5: Cepa 18, 6: Cepa 19, 7: testigo +, 8: testigo -, 9:MM de 1kbp.

Para el caso de las levaduras, tomando como condiciones de reacción y para el termociclador las planteadas en el cuadro 5, se obtienen los resultados mostrados en las Figuras 16A y B. Claramente se puede ver en la Figura 16A (correspondiente a resultados del *rep*-PCR) que en ninguna de las condiciones probadas se obtiene amplificación para ninguno de los aislados levaduriformes probados. Sin embargo en la figura 16B (Resultados para *eric*-PCR), se observa que si se obtuvo amplificaciones para ambas condiciones de reacción probadas para todos los aislados correspondientes al grupo de las *Rhodotorula* y no así para *Aureobasidium pullulans*. Los resultados obtenidos permiten sugerir que ninguna de las condiciones de amplificaciones probadas para el análisis por

rep-PCR logra amplificar ninguno de los grupos de levaduras en estudio, salvo el testigo positivo, no obstante para *eric*-PCR si se observa amplificaciones para todas las levaduras del grupo *Rhodotorula* , no así para la levadura *Aureobasidium*.

Para el caso de los hongos filamentosos se probaron diferentes condiciones de reacción a partir de las dadas en la metodología experimental, hasta que finalmente se obtuvo una condición de trabajo en la cual se obtuvieron los mejores resultados y que se reproduce a continuación:

Cuadro 5. Condiciones de reacción finales, para el desarrollo de las *rep*-PCR y *eric*-PCR de hongos filamentosos.

Condiciones de Reacción	<i>rep</i>-PCR 1X	<i>eric</i>-PCR 1X
Buffer 10 X (µL)	2.5	2.5
MgCl₂ 50 mM (µL)	0.75	0.75
PF (<i>rep</i> ó <i>eric</i> 1) (µL)	2.5	2.5
PR (<i>rep</i> ó <i>eric</i> 2) (µL)	2.5	2.5
dNTP'S 10 mM (µL)	0.5	0.5
Taq 5 U/ µL (µL)	0.5	0.5
H₂O mQ (µL)	14.25	14.25
BSA 10 % (µL)	0.5	0.5
DNA (µL)	1.0	1.0
Volumen final (µL)	25.0	25.0

Para el termociclador se siguieron condiciones similares a las explicadas en la metodología experimental solo que trabajando a T_m en condiciones de Touch down de 45-55 °C. La Figura 17 muestra una corrida rápida con el propósito de ver únicamente si se produjeron amplificaciones a las condiciones antes planteadas:

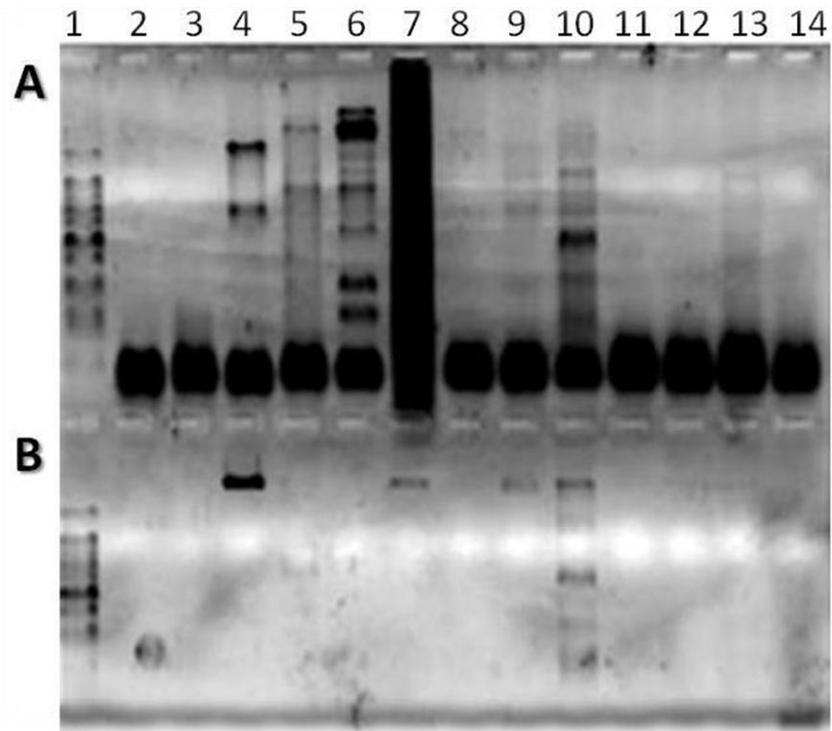


Figura 17. Gel de agarosa al 1.5 %. Para *eric*-PCR y *rep*-PCR de hongos. Panel A con iniciador *eric*: 1. MM de 100 bp, 2.II1, 3.II6, 4. III5, 5. II2, 6. III10, 7. I1, 8. III13, 9. III9, 10.T21, 11. III16, 12. III12, 13.Testigo positivo, 14. Testigo negativo. Panel B. Las mismas cepas y marcadores del carril A pero con iniciador *rep*.

En este caso para *eric*-PCR solo se logra amplificar las cepas III5, II2, III10, III13, III9 y T21, en el caso de la *rep*-PCR solo se logra amplificar la T21. Del análisis de los resultados anteriores se decidió probar variando condiciones de reacción y/o la T_m . Sin embargo, en todos los casos se obtuvo resultados muy similares al anterior, ya que se lograba amplificar solo algunos de los aislados tanto para *rep* como para *eric* a unas determinadas condiciones de reacción y de T_m , pero en todos los casos se observó mayores amplificaciones con *eric* que con *rep*.

A continuación se muestran los resultados de los aislados separados en amplificaciones con *rep*-PCR y *eric*-PCR en geles independientes para hongos filamentosos (Figuras 18 A y B):

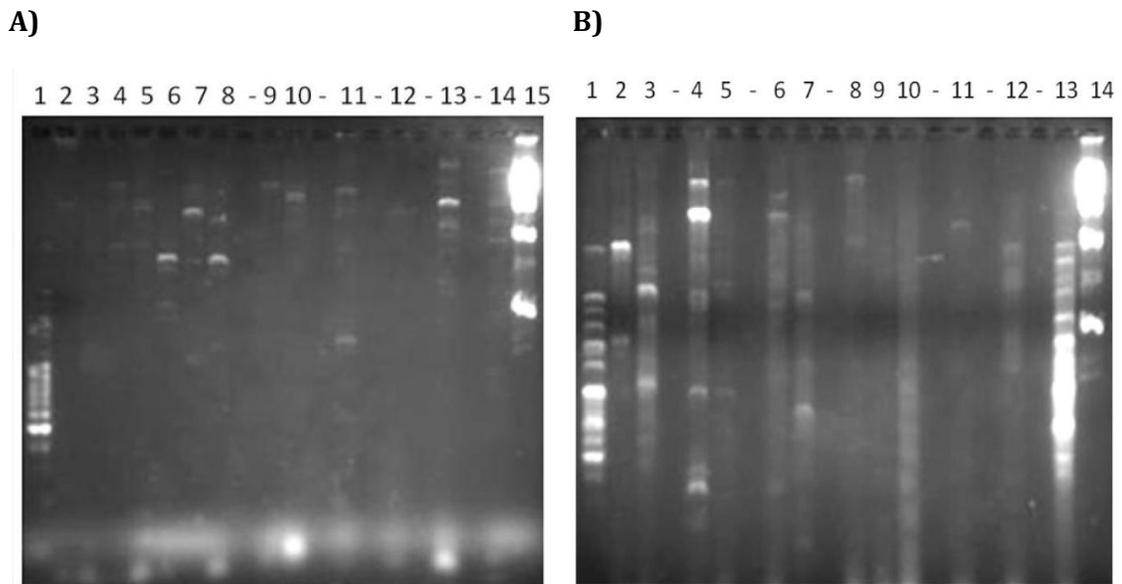


Figura 18. (A) Gel de agarosa al 2% para *eric*-PCR de hongos filamentosos. (B) Gel de agarosa al 2 % para *rep*-PCR de hongos filamentosos. Abreviaciones: A) 1. MM de 100 bp, 2. III5, 3.III2, 4. III10, 5.I1, 6. II2, 7.T21, 8. T12, 9.I7, 10. I10, 11.III13, 12. III9, 13. I4, 14. MM de 1 kbp. B) 1. MM de 100 bp, 2. T12, 3. I9, 4. I13, 5. II4, 6. I10, 7.III2, 8.I6, 9.III7, 10.II4, 11.T21, 12.III3, 13.III4, 14. II3, 15.MM de 1 kbp.

En la figura anterior (18 A y B), solo se mostró un ejemplo de las diferentes corridas que se realizaron en el proceso de amplificar cada uno de los aislados de hongos filamentosos, tanto con *eric*- como con *rep*-PCR. Del producto de los diferentes amplificados obtenidos en este proceso, se seleccionaron y agruparon los amplificados por cada uno de los géneros y así facilitar el proceso de análisis, estos resultados se muestran a continuación comenzando por el análisis al interior de los géneros *Fusarium* y *Cladosporium* con el iniciador *eric*-PCR (Figura 19A) y con el iniciador *rep*-PCR (Figura 19B).

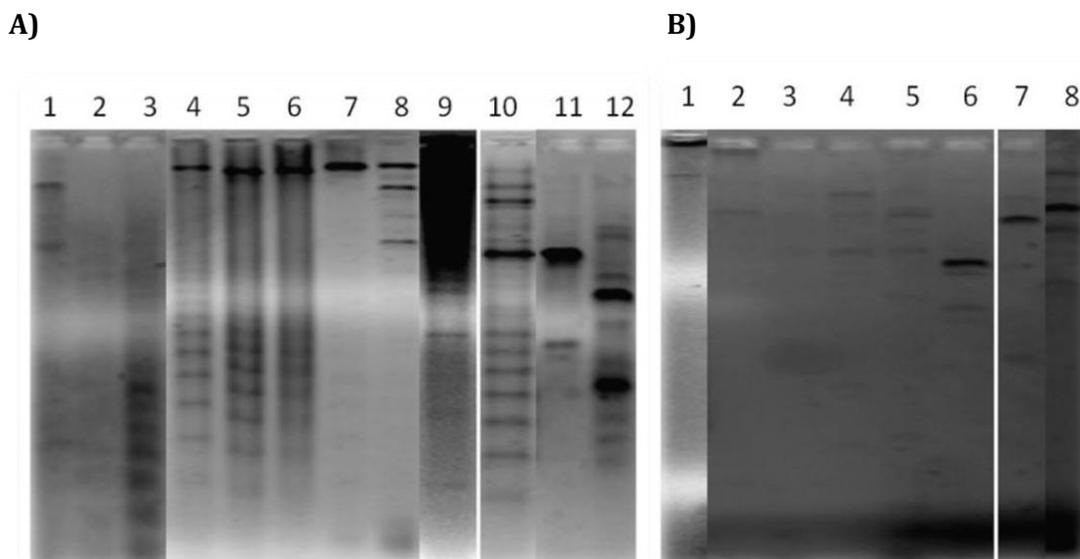


Figura 19. Composición de geles mostrando un resumen de los resultados para *eric*-PCR (A) y *rep*-PCR (B) para los hongos filamentosos de los generos *Fusarium* y *Cladosporium*. Abreviaciones: Panel (A) *Fusarium* (1. T12, 2. I7, 3. I10, 4. I9, 5. I2, 6. T11, 7. II4, 8. II1, 9. I13) y *Cladosporium* (10. III3, 11. III5, 12. III2). Panel B *Fusarium* (1. I2, 2. T12, 3. I9, 4. I13, 5. II4, 6. I10) y *Cladosporium* (7. III2, 8. III3).

Se puede ver de los dos geles anteriores, que con *eric*-PCR se obtuvieron 9 aislados amplificados, mientras que con *rep*-PCR solamente fue posible amplificar seis, para ambos casos se trabajó con un grupo de 10 aislados de *Fusarium*. En cuanto al género *Cladosporium*, en el primer caso (con *eric*-PCR) se amplificaron 3 y con *rep*-PCR solamente amplifican 2 y en ambos casos se trabajó con un grupo de tres aislados. De manera general se observa, no solo más amplificación con *eric* sino una mayor definición del patrón de bandeado obtenido en comparación con *rep*.

7.5.3. Identificación de hongos en general (filamentosos y levaduriformes) aislados por análisis de la secuencia ribosomal 26 S

Del total de 48 aislados de hongos filamentosos obtenidos, para 28 de esos aislamientos se obtuvo coincidencia plena en cuanto a género entre lo obtenido al analizar la morfología con los resultados obtenidos al analizar las secuencias nucleotídicas y compararla con las accesiones sacadas del análisis del GenBank (Cuadro 6), lo cual permitió en muchos de los casos conocer con mayor detalle la especie de la que se trataba. El cuadro siguiente resume todos los resultados obtenidos en la identificación morfológica y por secuenciación para los hongos filamentosos.

Cuadro 6. Comparación de la identificación de hongos filamentosos y levaduras, mediante información morfológica de los mismos con información de las secuencias nucleotídicas para cada microorganismo.

Código(número de acceso)	Iden. morfológica ^a	Vecino cercano (Número acceso)	Iden. Blast (%)	Muestra		
				I	II	III
II2 (HQ026780)	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma viride</i> (EF417482)	99	X		
II8 (HQ026781)	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma atroviride</i> (EF591763)	100	X		
T21(HQ026779)	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma harzianum</i> (AF399236)	100		X	
I1(HQ026798)	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Alternaria</i> sp. (AY154697)	98	X		
III10(HQ026799)	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Alternaria tenuissima</i> (AY154712)	98			X
III12(HQ018878)	<i>Mucor</i> sp.	<i>Mucor hiemalis f. hiemalis</i> (AY706241)	100			X
II6(HQ018877)	<i>Mucor</i> sp.	<i>Mucor hiemalis f. hiemalis</i> (AY706242)	99		X	
III13(HQ026777)	<i>Mucor</i> sp.	<i>Mucor hiemalis f. hiemalis</i> (AY706241)	97			X
II4(HQ026785)	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp. (FJ240316)	98		X	
T11(HQ026807)	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp. (FJ240316)	99	X		
T23(HQ026792)	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium solani</i> (EU029589)	99		X	
III1(HQ026787)	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp. (FJ240316)	99			X
I10(HQ026791)	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp. (FJ240316)	99	X		
T12(HQ026788)	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp. (FJ240316)	99	X		
II1(HQ026783)	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp. (FJ240316)	99		X	
I2(HQ026784)	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp. (FJ240316)	99	X		
I13(HQ026790)	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp. (FJ240316)	99	X		
I7(HQ026789)	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp. (FJ240316)	99	X		
I9(HQ026786)	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp. (FJ240316)	98	X		
III2(HQ026793)	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Cladosporium</i> sp. (EU810763)	99			X
III3(HQ026794)	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Cladosporium</i> sp. (FJ890368)	99			X
III5(HQ026795)	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Cladosporium</i> sp. (EU810763)	99			X
III11(HQ026796)	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Aspergillus fumigates</i> (FJ824816)	98			X
T22(HQ026797)	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Aspergillus niger</i> (GQ382273)	100		X	
III9(HQ018879)	<i>Epicoccum</i> sp.	<i>Leptosphaerulina australis</i> (EU754167)	96			X
III6(HQ026806)	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp. (EF634408)	99			X
I11(HQ026778)	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Phomas exigua</i> . (EU343365)	97	X		
III16(HQ026782)	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	<i>Pestalotiopsis</i> sp. (DQ195795)	99			X
11(HQ026800)	<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i> (FJ150929)	100	X		
15(HQ026801)	<i>Rhodotorula glutinis var dairenensis</i>	<i>Rhodotorula dairenensis</i> (FM212448)	99	X		
16(HQ026802)	<i>Rhodotorula glutinis var dairenensis</i>	<i>Rhodotorula dairenensis</i> (FM212448)	100	X		
17(HQ026803)	<i>Rhodotorula glutinis var dairenensis</i>	<i>Rhodotorula</i> sp. (AY437842)	99	X		
18(HQ026804)	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (EU642632)	99	X		
19(HQ026805)	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (EF644445)	95	X		

^aSegún cuadro 3.

El análisis del cuadro 6, de manera general nos permite afirmar que se obtuvo coincidencia plena entre la identificación morfológica y la identificación haciendo uso de la secuencia ribosomal 26S, salvo para el aislado III9 (HQ018879), el cual se identificó por vía morfológica como *Epicoccum* sp. y por vía de su secuencia ribosomal 26S como *Leptosphaerulina australis* (EU754167) con 96 % de identidad. En general, la identificación por vía de su secuencia ribosomal para este caso, se obtuvo con altos porcentajes de identidad que van del 95 al 100 %. Así mismo, del análisis de esta información se pueden diferenciar tres especies diferentes para el caso del Género *Trichoderma* como son *T. viride* (II2), *T. atroviride* (II8) y *T. harzianum* (T21). En el caso de los aislados identificados como pertenecientes el género *Alternaria* por los análisis morfológicos, en uno de dichos aislados no fue posible obtener su especiación por secuenciación (I1) y el otro resultó ser una *Alternaria tenuissima* (III 10) con porcentajes de homología del 98 %. De los tres aislados inicialmente identificados como *Mucor* sp. por morfología, los análisis de secuencia arrojaron en los tres casos (III12, II6, III13) que se trataba de *Mucor hiemalis f. hiemalis*. El grupo de los *Fusarium* (10 de los aislados mostrados en el Cuadro 6) fue uno de los más complicados para su identificación a nivel de especie, ya que solo fue posible identificar a nivel de especie solo una cepa como *Fusarium solani* (T23). Cabe destacar que estos resultados con *Fusarium* fueron obtenidos con un 98 % o más de homología en todos los casos, por lo que mayormente se reportan como *Fusarium* sp., al igual que las pruebas morfológicas. El género *Cladosporium* con tres aislados (III2, III3 y III5), tampoco fue posible su especiación aunque los resultados que se reportan en el Cuadro 6 reportan altos porcentajes de homología (99%), por lo que en este caso se recogen como *Cladosporium* sp. De los dos aislados caracterizados como *Aspergillus* en las pruebas morfológicas, los análisis de secuencias dieron que se trataban de las especies *Aspergillus fumigates* (III11) y *Aspergillus niger* (T22) con porcentajes de homologías del 98 y 100 %, respectivamente. Finalmente, otros aislados identificados en géneros como *Penicillium*, *Phomas* y *Pestalotiopsis* por medio de la morfología, solo se pudieron identificar a nivel de género por secuenciación y por ende se reportan como *Penicillium* sp., *Phomas* sp. y *Pestalotiopsis* sp. con un 97 a 99 % de homología.

Para el caso de las levaduras (Cuadro 6), de comparar los resultados obtenidos con la aplicación del API20 C AUX (Cuadro 4), se puede ver que se obtuvo buena coincidencia entre los resultados de las diferentes pruebas bioquímicas con la identificación llevada a cabo con la aplicación de las secuencias nucleotídicas en cuanto a género y especie para las cepas 11, 15, 16, 18 y 19. No obstante para la cepa 17 no fue posible establecer con claridad la especie por medio de secuenciación por lo que se reporta acá como *Rhodotorula* sp., aunque por bioquímica del cuadro 4 no se distinguía entre las cepas 15 al 17 y todas se reportaban como *Rhodotorula glutinis var dairinensis*. La diferencia del aislado 17 a la hora de definir especie por medio de secuenciación (Cuadro 6), coincide con lo observado por

medio de los análisis de *eric*-PCR (Figura 16 B) en la cual se puede ver que según el patrón de bandeo se pueden distinguir tres grupos de especies diferentes.

Los resultados obtenidos con las secuencias de hongos (filamentosos y levaduriformes, Apéndice A, cuadro 18), fueron utilizados para elaborar el dendrograma y análisis del OTU de *Fusarium* que se presenta a continuación (Figuras 20 y Figura 21).

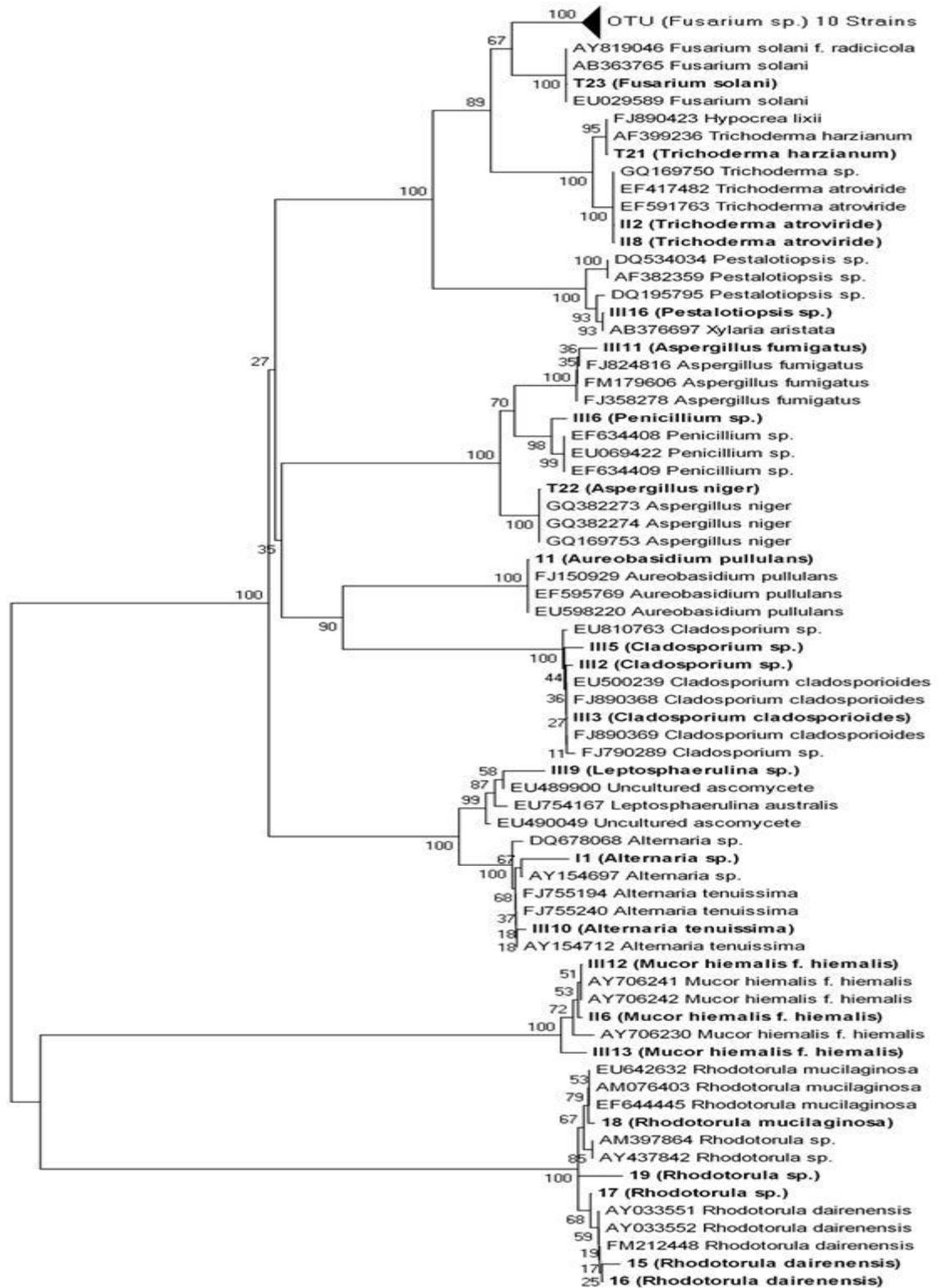


Figura 20. Árbol filogenético de aislados de hongos utilizando el método de pares vecinos y máxima parsimonia. Las ramificaciones corresponden a valores de bootstrap (alrededor de 1000 repeticiones). El OTU *Fusarium* sp. fue resumido en un grupo. Los números de accesión son representados en paréntesis. Las cepas que corresponden a este estudio aparecen en negrilla.

En la figura anterior podemos ver como todos nuestros aislados se agrupan correctamente en clados muy bien diferenciados para cada uno de los géneros identificados por medio de este estudio. Así es posible identificar géneros como *Cladosporium*, *Mucor*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Rhodotorula* y *Aureobasidium* entre otros que se identifican en sus clados correspondientes. Del grupo de los *Fusarium*, solo fue posible identificar a nivel de especie al aislado T23, como *Fusarium solani* y para diferenciar los restantes aislados correspondientes a este género se elaboró la siguiente figura correspondiente al OTU *Fusarium* de la figura anterior.

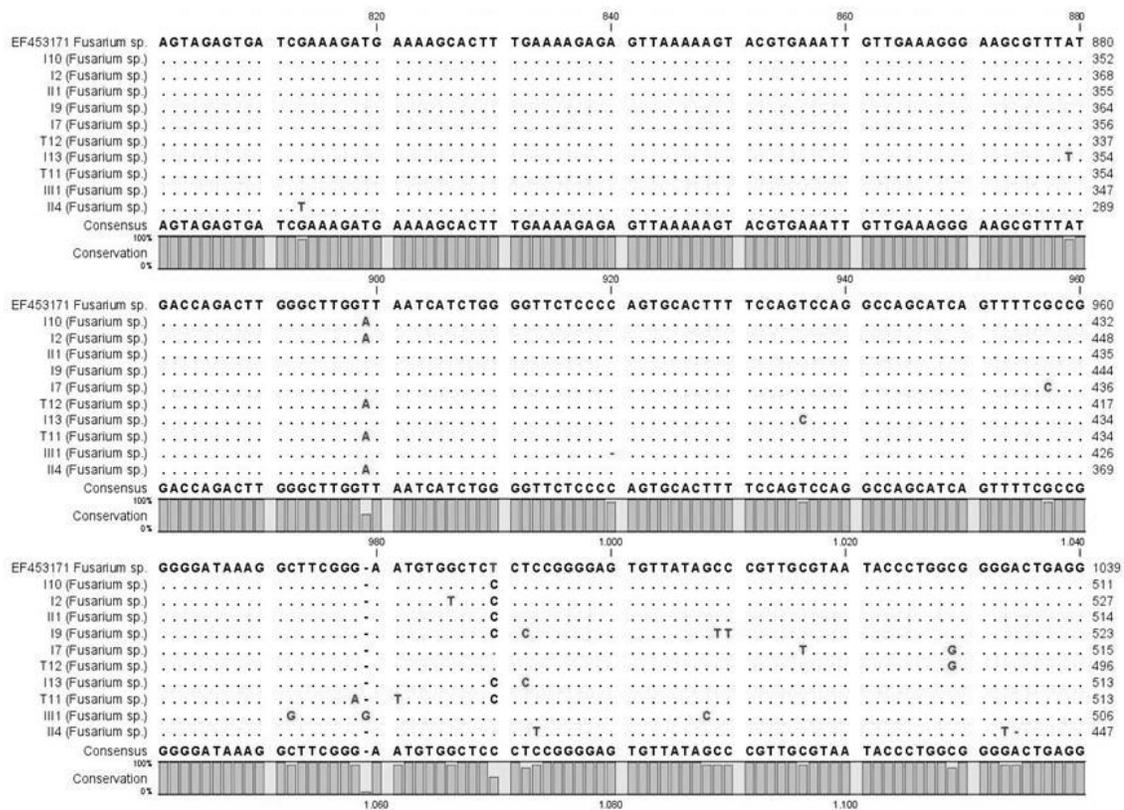


Figura 21. Alineación representativa de secuencias de cepas de hongos marcadas como OTU de *Fusarium* sp. en la Figura 20. Los números (mostrados al final del alineamiento) corresponden a los números originales del nucleótido de ese aislado. En la secuencia alineada, un punto representa la identidad nucleotídica al detenerse la secuencia consenso (*Fusarium* sp. número de accesión EF453171). Los polimorfismos en las diferentes secuencias están indicados. La gráfica gris en la parte inferior de la figura muestra la parte conservada de la secuencia dentro de cada grupo anotado.

El análisis del grupo *Fusarium* que se representa por medio del OTU en la figura 20 y que se grafica en la Figura 21, nos muestra las diferencias que existen a nivel de nucleótidos entre cada uno de los aislados representados en ese grupo. Por tanto, un mayor estudio será requerido para alcanzar una identificación plena a nivel de especie de cada uno de esos aislados, ya que esas diferencias a nivel de nucleótidos podrían estarnos indicando que en la realidad se trata de especies diferentes pertenecientes a un mismo género, en este caso *Fusarium*. Finalmente, cada una de estas 34 secuencias de hongos fue subida al GenBank y se les asignó números de accesión, los cuales se reportan en el cuadro 6. Los resultados integrados del análisis de la Figura 20 correlacionados con el análisis de la Figura 21, nos llevan a demostrar las diferencias que existen entre los diferentes aislados de los géneros de estudio, lo que explica las diferencias que se pueden ver entre algunos de ellos en los patrones de bandeo que se obtienen por medio de *eric-* y *rep-*PCR (Figuras 16, 18 y 19).

7.5.4. Identidad molecular de aislados bacterianos

La identificación de las bacterias aisladas se logró a través de la aplicación de métodos moleculares. Para ello se llevó a cabo la amplificación del ADN mostrado en la Figura 22, utilizando iniciadores para la región 16S además del Com1 y Com2 con las condiciones de reacción y para el termociclador que fueron dadas en la metodología. La Figura 23 recoge un ejemplo de los resultados obtenidos en el proceso de amplificación de los más de 70 aislados obtenidos, en este caso se trabajó en Touch Down de 50 a 59 °C. De manera general no siempre se logró obtener los mismos amplificados para ambos iniciadores utilizados ya que en algunos casos se lograban amplificar solo con el 16 S y otros solo con el iniciador Com con un buen número de aislados amplificados por ambos iniciadores. Algunos de los resultados obtenidos representativos durante el proceso de amplificación de bacterias se muestran a continuación:

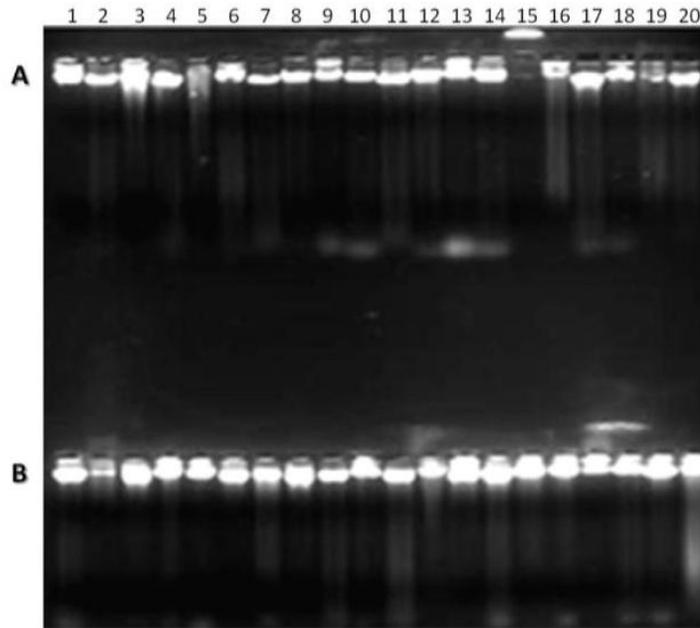


Figura 22. ADN de bacterias aisladas. Carril A: 1. 24, 2. 13, 3. IS4, 4. 35, 5. IIS2, 6. IS14, 7. 23, 8. IIS4, 9. IS10, 10. 26, 11. IS13, 12. 28, 13. 27, 14. 21, 15. IIS7, 16. IS3, 17. 32, 18. IS1, 19. IIS15, 20. IIS9. Carril B: 1. 12, 2. 33, 3. IS12, 4. 25, 5. IIS8, 6. IIS6, 7. IIS4, 8. IS2, 9. 37, 10. IIS16a, 11. 34, 12. IIS5, 13. IS7, 14. 31, 15. IIS12, 16. IIS16, 17. IIS5, 18. 14, 19. IIS17, 20. 36.

Los resultados del análisis del gel muestran que solamente las cepas IIS2 y IIS7 (Carriles A) no fue posible visualizar el ADN extraído. Por tanto consideramos que tenemos el ADN de 38 muestras para continuar trabajando. En una segunda etapa de extracción de ADN para los restantes aislados bacterianos se completó el proceso de extracción siguiendo el mismo método que en la primera etapa que fue el método de Fenol-Cloroformo (Raeder y Broda, 1985):

Al contar con todo el ADN de los diferentes aislados bacterianos se dio inicio al proceso de amplificación utilizando los iniciadores 16S y Com, como se describió en la metodología experimental. Con esas condiciones se obtuvieron los siguientes resultados para la amplificación de bacterias (Figura 23).

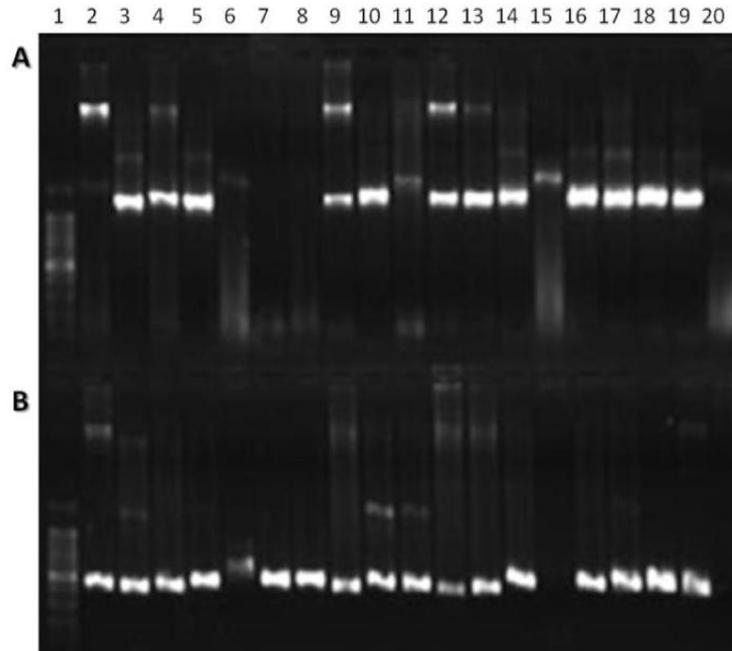


Figura 23. PCR 16S (Carriles A) y Com (carriles B) de bacterias. Carriles A: 1. MM de 100 bp, 2. 1, 3, 3, 4, 5, 5, 7, 6, 8, 7, 9, 8, 10, 9, 11, 10, 12, 11, 17, 12, 18, 13, 19, 14, 25, 15, 26, 16, 27, 17, 29, 18, 30, 19. Testigo positivo, 20. Testigo negativo. Los carriles B, siguen la misma disposición de los carriles A pero en este caso es con iniciador Com.

Del análisis del gel se decide conservar todas las muestras amplificadas excepto: Las cepas 1, 11 y 18, de las amplificadas con 16 S y las cepas 12 y 17 de las amplificadas con los iniciadores Com. Estas cepas se corren nuevamente, pero aumentando la Tm del Touch Down de 52 a 62 °C. En el caso de las cepas en que no se muestra ningún ADN se verificó la muestra original para repetir la dilución, realizar un lavado al ADN ó correr la muestra con el ADN directo según se obtuvieran los mejores resultados.

En total se logró amplificar 47 aislados con el iniciador Com, 46 aislados amplificadas con el iniciador 16 S y 38 aislados amplificadas por ambos iniciadores a la vez. Estos 38 aislados bacterianos amplificadas con los dos iniciadores seleccionados para la región ribosomal fueron seleccionados para continuar con el proceso de identificación y de su potencial biotecnológico. Los aislados que solo fueron responsivos para una de las combinaciones de iniciadores de PCR fueron descartados del análisis posterior ya que podrían presentar menos consistencia en su identificación molecular. Los resultados de la secuenciación que se muestran más adelante nos indican que trabajos posteriores, deberán dilucidar la diferencia entre grupos de *Bacillus* pertenecientes a una misma especie, por ejemplo *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus cereus* y *Bacillus simplex*, entre otros a los cuales pertenecen buena cantidad de los aislados obtenidos.

7.6. Identificación de aislados bacterianos por análisis de las secuencias ribosomales 16S y Com

Los aislados bacterianos amplificados fueron enviados a secuenciación según lo descrito en materiales y métodos, pero purificando con el X-terminator. Los resultados obtenidos de este proceso se resumen en el Cuadro7.

Cuadro 7. Identificación de bacterias aisladas mediante secuenciación, utilizando los iniciadores Com y 16 S.

Código	Vecino cercano (Número de acceso) Iniciador 16S	ide n(%)	Vecino cercano (Número de acceso) Iniciador Com	ide n(%)	Identidad final	Muestra		
						1	2	3
IIS5	<i>Bacillus</i> sp. (EU365432)	99	NA	NA	<i>Bacillus</i> sp.		X	
IIS15r	NA	NA	<i>B.subtilis</i> (AB364963)	99	<i>B. subtilis</i>		X	
IS4	<i>Bacillus</i> sp. (EU365432)	99	<i>B. subtilis</i> (AB364963)	100	<i>B. subtilis</i>	X		
IS5	<i>Bacillus</i> sp. (AF539663)	99	<i>B. subtilis</i> (AB364963)	100	<i>B. subtilis</i>	X		
IIS9b	<i>B. subtilis</i> (GQ861468)	100	<i>B. subtilis</i> (FJ685769)	100	<i>B. subtilis</i>			X
IS3	<i>B. subtilis</i> (GQ861468)	99	<i>B.subtilis</i> (AB364963)	100	<i>B. subtilis</i>	X		
IIS2	<i>B. subtilis</i> (FJ174629)	99	NA	NA	<i>B. subtilis</i>			X
IIS10	<i>B. subtilis</i> (FJ174629)	99	<i>B. subtilis</i> (AB364963)	100	<i>B. subtilis</i>			X
IS16	<i>B.subtilis</i> (GQ861468)	98	<i>B.subtilis</i> (GQ375229)	99	<i>B. subtilis</i>	X		
36	NA	NA	<i>B. subtilis</i> (EF473134)	99	<i>B. subtilis</i>			X
IIS11	<i>B. cereus</i> (GU568207)	100	NA	NA	<i>B. cereus</i>			X
IIS17	<i>B. cereus</i> (GU568207)	100	<i>B. cereus</i> (DQ884352)	100	<i>B. cereus</i>		X	
IIS15a	<i>B. cereus</i> (FJ763651)	100	<i>B. cereus</i> (GU471752)	99	<i>B. cereus</i>		X	
IIS9a	<i>B. cereus</i> (FJ763651)	100	<i>B. cereus</i> (GU471752)	98	<i>B. cereus</i>			X
IS12	<i>B. cereus</i> (AF290554)	99	<i>B. cereus</i> (FJ763651)	99	<i>B. cereus</i>	X		
25	NA	NA	<i>B. cereus</i> (GU395988)	98	<i>B. cereus</i>		X	
IS9	NA	NA	<i>B. cereus</i> (GU471752)	99	<i>B. cereus</i>	X		
IIS5	<i>B. simplex</i> (GU201860)	100	<i>Bacillus</i> sp. (EU070399)	99	<i>B. simplex</i>			X
32	<i>B. simplex</i> (GU201860)	100	<i>Bacillus</i> sp. (AB425367)	100	<i>B. simplex</i>			X
IIS12	<i>B.simplex</i> (GU086427)	99	<i>Bacillus</i> sp. (AB425367)	99	<i>B. simplex</i>	X		
IIS5	<i>B.simplex</i> (GU086427)	100	NA	NA	<i>B. simplex</i>			X
IIS3	<i>B. simplex</i> (DQ275175)	100	<i>Bacillus</i> sp. (AB425367)	98	<i>B. simplex</i>	X		
31	<i>B. simplex</i> (GU201860)	99	<i>Bacillus</i> sp. (AB425367)	99	<i>B. simplex</i>			X
IIS9	<i>B. pumilus</i> (FJ763642)	99	<i>Bacillus pumilus</i> (FN652913)	100	<i>B. pumilus</i>	X		
IIS2	<i>B. pumilus</i> (FJ763642)	100	<i>B.pumilus</i> (FN652913)	99	<i>B. pumilus</i>		X	
IIS10	<i>B.pumilus</i> (FJ763642)	99	<i>B. pumilus</i> (FN652913)	99	<i>B. pumilus</i>		X	
IS8	<i>B.pumilus</i> (AY289549)	99	<i>B. pumilus</i> (GQ891100)	100	<i>B. pumilus</i>	X		
IIS7	<i>B.pumilus</i> (FJ763642)	99	NA	NA	<i>B. pumilus</i>		X	
13	NA	NA	<i>B. pumilus</i> (FN652913)	99	<i>B. pumilus</i>	X		
IS15	NA	NA	<i>B. pumilus</i> (GQ849562)	99	<i>B. pumilus</i>	X		
IIS4	<i>B. megaterium</i> (FJ976554)	99	<i>B. megaterium</i> (GU048867)	99	<i>B. megaterium</i>			X
IIS1	<i>B. psychrodurans</i> (EU249566)	100	<i>B. psychrodurans</i> (EF101552)	100	<i>B. psychrodurans</i>		X	
IIS6	<i>Oceanobacilus</i> sp. (EU308470)	100	<i>Oceanobacilus</i> sp. (AB491187)	100	<i>Oceanobacilus</i> sp.			X
33	<i>S. saprophyticus</i> (GQ365197)	99	NA	NA	<i>S.saprophyticus</i>			X
IIS16a	<i>Microbacterium</i> sp. (FJ654469)	99	NA	NA	<i>Microbacterium</i> sp.		X	
IIS16	<i>Microbacterium</i> sp. (FJ654469)	99	NA	NA	<i>Microbacterium</i> sp.		X	
IS7	<i>Kocuria</i> sp. (FJ889675)	99	<i>Kocuria</i> sp. (FJ005072)	99	<i>Kocuria</i> sp	X		
IIS9	<i>Arthrobacter</i> sp. (FJ626795)	99	<i>Arthrobacter</i> sp (DQ145751))	100	<i>Arthrobacter</i> sp			X
IS2	<i>Arthrobacter</i> sp. (FN673551)	99	<i>Arthrobacter</i> sp. (DQ145750)	100	<i>Arthrobacter</i> sp.	X		
IIS3	NA	NA	<i>Arthrobacter</i> sp. (DQ145750)	100	<i>Arthrobacter</i> sp.			X

IIS19a	<i>Brevundimonas</i> sp. (DQ177489)	99	NA	NA	<i>Brevundimonas</i> sp.	X
IS6	<i>B. simplex</i> (DQ275175)	99	<i>P.a agglomerans</i> (GQ494018)	99	<i>P. agglomerans</i>	X
21	<i>P.agglomerans</i> (FJ999950)	99	<i>P. agglomerans</i> (GQ494018)	99	<i>P. agglomerans</i>	X
IIS4	<i>P. agglomerans</i> (AF157694)	100	<i>P. agglomerans</i> (GQ494018)	99	<i>P. agglomerans</i>	X
IS14	NA	NA	<i>P. agglomerans</i> (GQ494018)	99	<i>P. agglomerans</i>	X
27	<i>Stenotrophomonas</i> sp. (AY131216)	98	<i>Bacillus</i> sp (AB425367)	99	<i>Stenotrophomonas</i> sp	X
IS10	<i>Pseudomonas</i> sp. (FJ422398)	99	NA	NA	<i>Pseudomonas</i> sp.	X
IS17a	<i>Pseudomonas</i> sp. (EU934229)	99	<i>Pseudomonas</i> sp. (AB506046)	99	<i>Pseudomonas</i> sp.	X
IS1	<i>Pseudomonas</i> sp. (FJ006865)	99	<i>Pseudomonas</i> sp. (AB506047)	99	<i>Pseudomonas</i> sp.	X
IS17	NA	NA	<i>Pseudomonas</i> sp. (AB506047)	100	<i>Pseudomonas</i> sp.	X
IIS8	NA	NA	<i>Curtobacterium</i> sp. (GU300532)	100	<i>Curtobacterium</i> sp.	X

Del cuadro 7 es importante resaltar que de 41 secuencias obtenidas por medio del iniciador 16 S e igual número de secuencias obtenidas por el iniciador Com, se obtuvo coincidencia plena de los resultados de identificación en 30 de los aislados pertenecientes a los géneros y especies bacterianas antes citadas. En 10 de los casos solo se obtuvo la secuencia por uno de los genes secuenciados y solamente en uno de los aislados (IS6) fue reportado como *Bacillus simplex* (DQ275175) por medio del iniciador 16 S con un 99 % de homología y como *Pantoea agglomerans* (GQ494018) por medio del iniciador Com con un 99 % de homología, mostrándose solamente diferencias para con este aislado. Los casos que se registran en el cuadro 7 por medio de únicamente uno de los iniciadores, es debido a que no fue posible obtener su amplificación por medio del otro iniciador a las condiciones en que se desarrolló la amplificación para este trabajo.

Un aspecto importante a destacar es que *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* y *Bacillus pumilus* entre otros se encuentran presentes en las diferentes biopelículas muestreadas en los puntos I, II y III (Figura 8). Sin embargo, otros microorganismos como *Bacillus simplex*, *Bacillus psychrodurans*, *Bacillus megaterium*, *Microbacterium* sp. y *Oceanobacillus* sp. se encuentran distribuidos fundamentalmente en las biopelículas ubicadas en los puntos II y III (Figuras 8C, 8E y 8F) de las muestreadas asociadas al Castillo de Chapultepec. El árbol filogenético construido considerando las secuencias obtenidas con el iniciador 16S, se muestra a continuación (Figura 24):

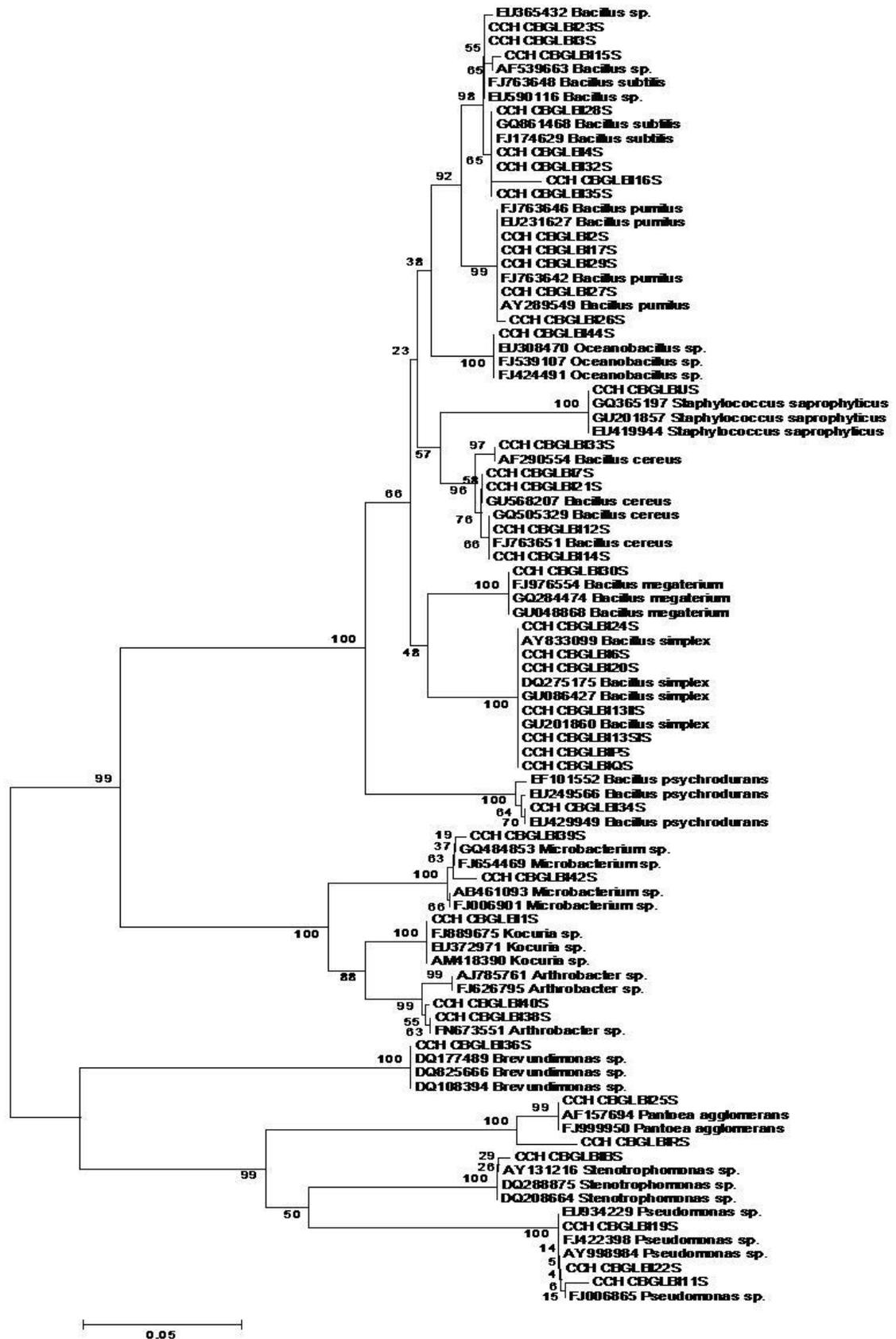


Figura 24. Árbol Filogenético de aislados de bacterias correspondiente a secuencias obtenidas con el

iniciador 16S, utilizando el método de pares vecinos y máxima parsimonia. Las ramificaciones corresponden a valores de bootstrap (1000 repeticiones).

La figura 24 muestra los diferentes géneros agrupados correctamente en sus correspondientes clados por especie. Así podemos diferenciar especies como: *Bacillus subtilis*, *Bacillus simplex*, *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus megaterium* y *Bacillus psychrodurans*, entre otros. Otros géneros como *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Brevundimonas*, *Microbacterium* y *Kokuria* se diferencian muy bien según la separación de los clados en el árbol filogenético obtenido. Aquí es posible observar que el aislado IS6 se ubica dentro de clado de *Bacillus simplex*. Al mismo tiempo se construyó el árbol filogenético para las secuencias obtenidas de bacterias con el iniciador Com y de esta forma poder comparar los resultados obtenidos por ambos iniciadores en la identificación de los aislados procedentes del Castillo de Chapultepec, la Figura 25 recoge estos resultados.

A diferencia del árbol filogenético con el iniciador 16S (Figura 24), el árbol obtenido para el iniciador Com no separa adecuadamente los clados de *Bacillus subtilis* y *Bacillus pumilus*, ya que estos se entremezclan entre sí. Similares resultados a los mostrados en la figura 25, fueron obtenidos cuando se realizaron diferentes variantes para este árbol filogenético, por lo que los resultados que muestra esta Figura 25, fue el árbol consenso que mejor separó los diferentes géneros y especies obtenidas para este trabajo. Géneros como *Pantoea*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas* son separados en sus clados correspondientes, así como *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium* y *Bacillus psychrodurans*.

En términos generales es posible sugerir que el iniciador 16 S fue más conveniente para el agrupamiento filogenético de las cepas ya que permite una mejor diferenciación de los clados correspondientes a cada uno de los grupos bacterianos en estudio (Figura 24). No obstante, a través del empleo de ambos iniciadores ribosomales fue posible obtener gran coincidencia en la identificación para prácticamente todos los aislados secuenciados por ambos genes, exceptuando uno (IS6) que fue identificado como *Bacillus simplex* según el iniciador 16 S y como *Pantoea agglomerans* según el iniciador Com (Figura 26). Finalmente los aislados identificados y su correspondiente número de accesión al GenBank se resumen en el apéndice A, cuadro 18.

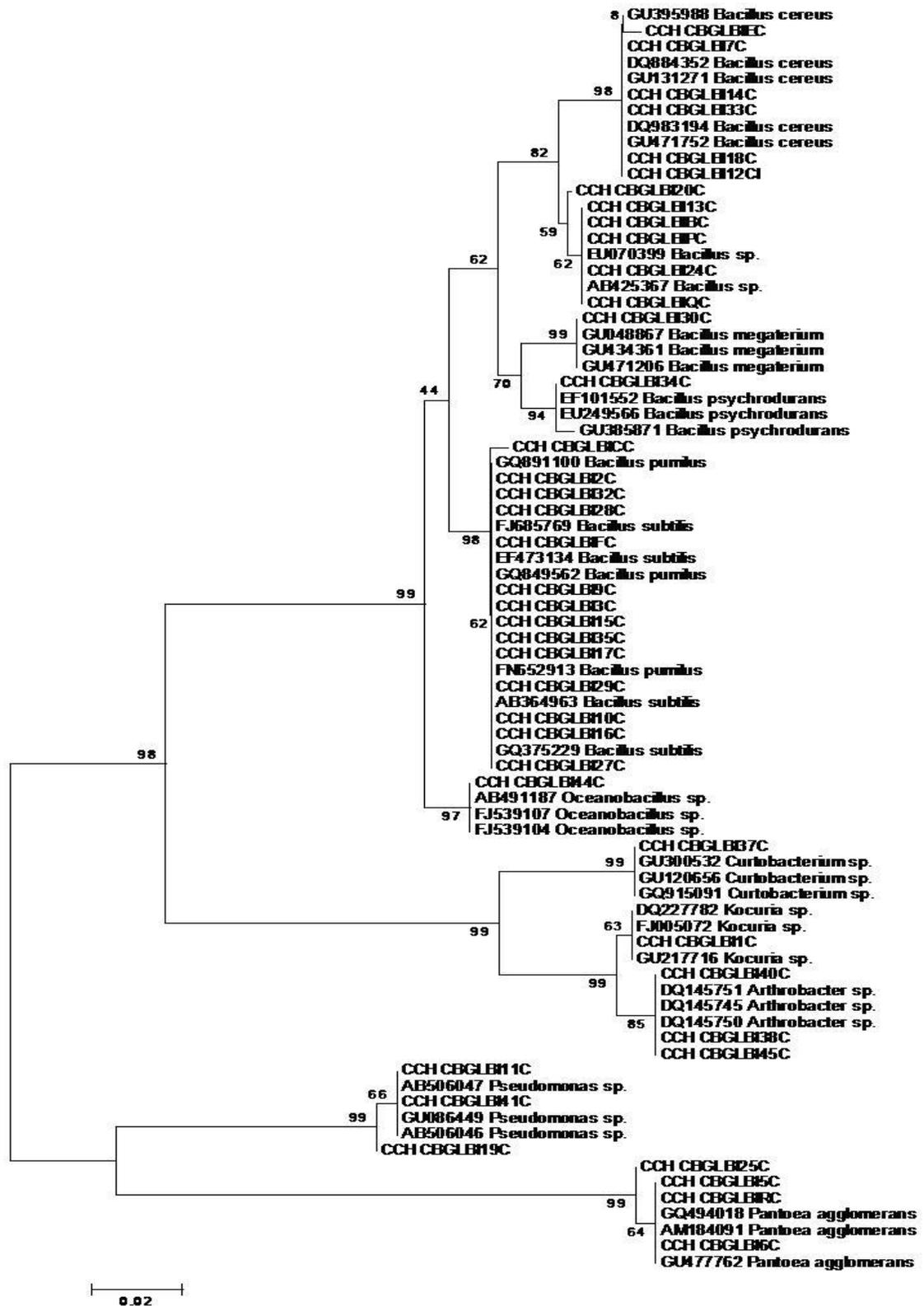


Figura 25. Árbol Filogenético de aislados de bacterias correspondiente a secuencias obtenidas con el iniciador Com, utilizando el método de pares vecinos y máxima parsimonia. Las ramificaciones corresponden a valores de bootstrap (1000 repeticiones).

Con el fin de ampliar la claridad de los resultados antes mostrados, se comparó al detalle el análisis de los clados paralelos y que no se corresponden para *B. simplex* y *P. agglomerans* de las Figuras 24 y 25, respectivamente (Figura 26). Aquí puede observarse la consistencia en la identificación de la cepa IS6 para ambos iniciadores ribosomales.

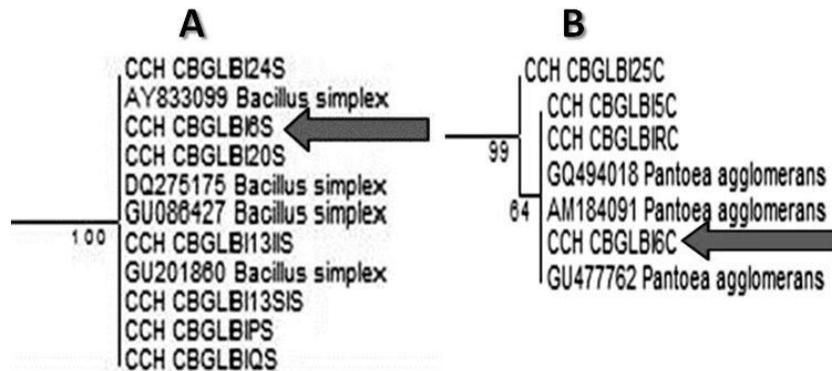


Figura 26. Sección del árbol filogenético que muestra el clado con el aislado IS6. (A) Según el árbol filogenético obtenido para el iniciador 16 S que lo identifica como *Bacillus simplex* (DQ275175) con 99 % de homología. (B) Según el árbol filogenético obtenido para el iniciador Com que lo identifica como *Pantoea agglomerans* (GQ494018) con un 99 % homología.

7.7 Ensayo de formación de la biopelícula en micro placa

7.7.1 Fase 1: Primer ensayo para la formación de biopelículas

En esta sección se describen los resultados relacionados con el potencial biotecnológico, particularmente con el de bio-restauración de superficies, de algunas de las cepas aisladas. Para este análisis se trabajó particularmente con la población bacteriana completamente identificada con al menos dos iniciadores ribosomales (30 cepas, cuadro 7). En primera instancia se evaluó el potencial formador de biopelícula en estos aislados por su crecimiento en placa como se describe en la metodología. En este análisis se consideró que según el índice de McFarlan A (Absorbancia): 0.09-0.1 corresponden aproximadamente a $1.0E+08$ UFC (Unidades Formadoras de Colonias). De esta forma se evaluaron las 30 cepas a las 24 horas de incubación en medio líquido LB (Luria Bertani, Miller) con los siguientes resultados (Figura 27A).

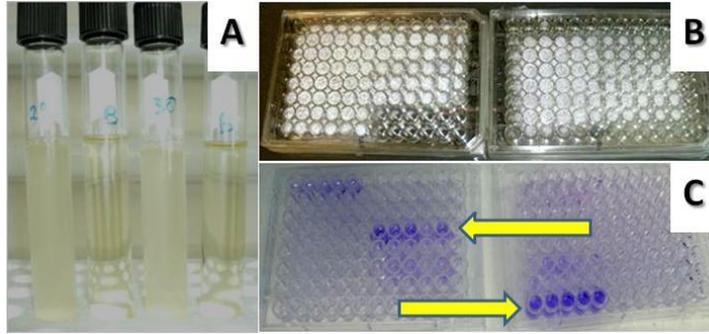


Figura 27. Crecimiento de bacterias en diferentes momentos del proceso de formación de biopelícula a 24 horas. (A) Crecidas en tubo, (B) Crecidas en micro placa y (C) Cepas que muestran formación de biopelícula. Las flechas indican los aislados con mejor formación de biopelícula.

De cada una de las cepas crecidas a las 18 horas aproximadamente se tomaron 100 μ L y fueron llevados a micro placas previamente preparadas según se detalló en la metodología experimental, utilizándose como blanco el medio LB sin inocular y puestos a incubar por 24 y 48 horas el duplicado de las placas. Finalizadas las primeras 24 horas se llevaron las placas (Figuras 27B y 27C) al lector de microplacas BIO-RAD 550 y se leyó la absorbancia para cada uno de los pozos (Cuadro 8).

Cuadro 8. Valores de absorbancia ($A_{540\text{nm}}$) en microplaca para cada una de los seis mejores aislados en cuanto a formar biopelículas a las 24 horas de incubación de un total de 30 aislados de estudio.

Cepa IS4	Cepa IS16	Cepa IIS15a	Cepa IIIS10	Cepa IIIS4	Cepa IIIS5
0.042	0.762	0.092	0.84	0.035	0.063
0.171	0.841	0.179	0.426	0.033	0.132
0.303	1.036	0.269	0.582	0.021	0.14
0.096	0.989	0.248	0.184	0.007	0.056
0.048	1.094	0.234	0.426	0.014	0.131
Promedio($A_{540\text{nm}}$) \pm SD					
0.132 \pm 0.0971	0.94 \pm 0.12	0.20 \pm 0.06	0.49 \pm 0.21	0.02 \pm 0.01	0.10 \pm 0.03

En micro placa a las 24 horas predominó el crecimiento de bacterias aisladas de los puntos uno y dos de los muestreados, mientras que en tubo se obtuvo crecimiento de aislados de los diferentes puntos. Una vez leída la absorbancia (Cuadros 8 y 9) se procedió a lavar las bacterias no adheridas a la superficie de los pozos y teñir con cristal violeta, según lo explicado en la metodología experimental. Después del teñido fue posible observar biopelículas adheridas a la superficie de las biopelículas para las cepas: IS4 (*Bacillus subtilis*), IS16 (*Bacillus subtilis*), IIS15a (*Bacillus cereus*), IIIS10 (*Bacillus subtilis*), IIIS4 (*Bacillus megaterium*) y IIIS5 (*Bacillus simplex*), siendo las 3 mejores en cuanto a formar

biopelículas a las 24 horas las cepas IS16 (*Bacillus subtilis*), IIS15a (*Bacillus cereus*) y la IIS10 (*Bacillus subtilis*) (Figura 27C). Del análisis de estos resultados a las 24 horas, se desprende el hecho de que una cepa, la número 21 (*Pantoea agglomerans*), no fue capaz de crecer mejor tanto en medio líquido como en tubo.

Siguiendo un procedimiento similar al descrito para 24 horas, a las 48 horas de incubación se retiraron las micro placas (Figura 28) y se leyó absorbancia para cada una de las cepas y sus cinco replicas, esto permitió determinar el crecimiento en micro placa a las 48 horas y la desviación estándar. Finalmente, la lectura de la absorbancia para cuantificar la biopelícula formada, arroja que las 3 mejores cepas formadoras de biopelículas a las 48 horas fueron: IS16 (*Bacillus subtilis*), IIS15a (*Bacillus cereus*) y IIS9b (*Bacillus subtilis*) (resultados mostrados en Cuadro 9; Figuras 28A y 28B).

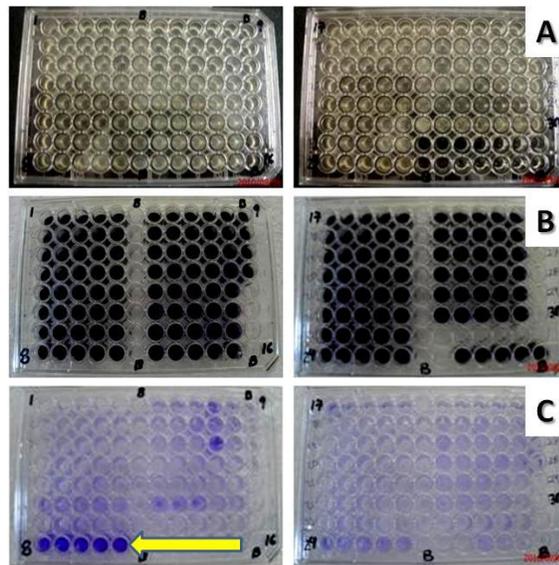


Figura 28. Proceso de formación de la biopelícula en micro placa a 48 horas de incubación. (A) Recién retiradas de incubación. (B) Durante el teñido con cristal violeta. (C) Cepas que forman biopelícula. La flecha indica los aislados con mejor formación de biopelícula.

Cuadro 9. Valores de absorbancias promedios y sus correspondientes desviaciones estándar, durante todo el proceso de formación de biopelícula, desde el crecimiento en tubo, pasando por microplaca hasta el biofilm a 24 y 48 horas respectivamente para la fase 1 (sin glucosa) y 2 (con 0.1% de glucosa).

Fase	Cepas	Inicial	En placa a A _{540nm}		En tubo a A _{540nm}	
			24h	48h	24h	48h
1	<i>Cepa IS16</i>	0.191	0.94 ± 0.12	0.54 ± 0.08	0.02 ± 0.21	0.01 ± 0.02
	<i>Cepa IIS15a</i>	1.278	0.20 ± 0.06	0.62 ± 0.17	0.04 ± 0.06	0.07 ± 0.05
	<i>Cepa IIIS10</i>	0.197	0.49 ± 0.21	0.53 ± 0.11	0.04 ± 0.02	0.06 ± 0.02
2	<i>Cepa IS16</i>	0.135	0.05 ± 0.48	0.08 ± 0.14	0.01 ± 0.005	0.05 ± 0.007
	<i>Cepa IIS15a</i>	1.278	0.5 ± 0.03	0.39 ± 0.07	0.005 ± 0.003	0.07 ± 0.009
	<i>Cepa IIIS10</i>	1.278	1.05 ± 0.05	1.35 ± 0.03	0.02 ± 0.013	0.08 ± 0.01

Podemos ver en el cuadro anterior que al reiniciar el crecimiento a nivel de microplaca, de manera general se obtiene un mayor crecimiento microbiano, salvo para la cepa IIS15a. Un mayor tiempo de incubación hasta las 48 horas, de manera general favorece la multiplicación microbiana, salvo para la cepa IS16. Finalmente y con respecto a la formación de biopelícula, aparentemente un mayor tiempo de incubación, favorece cuantitativamente la formación de la misma, pero esto no es cierto para todos los caso en estudio.

A 48 horas de incubación, las cepas que reportan un mayor crecimiento en microplaca fueron: 27 (*Stenotrophomonas* sp.), 21 (*Pantoea agglomerans*), IIS1 (*Bacillus psychrodurans*), IIS12 (*Bacillus simplex*) y 32 (*Bacillus simplex*). Las cepas que reportan un mayor crecimiento a 48 horas no coinciden en general con las obtenidas en iguales condiciones, pero leídas a las 24 horas, salvo para las cepas 21 (*Pantoea agglomerans*) y IIS1 (*Bacillus psychrodurans*). Esto puede explicarse según lo que se ha observado en el crecimiento de las cepas que en su mayoría crecen entre las 18 y 24 horas en tubo, salvo algunos casos que requieren más de 24 horas para que se observe un completo crecimiento entre las que están las cepas: 27 (*Stenotrophomonas* sp.), IIS12 (*Bacillus simplex*) y 32 (*Bacillus simplex*). Se lavaron las placas y luego del teñido de las mismas (Figura 28B) en las que se observó crecimiento de biopelícula (Figura 28C) para las cepas: IS16 (*Bacillus subtilis*), IS6 (*Pantoea agglomerans*), IS3 (*Bacillus subtilis*), IS5 (*Bacillus subtilis*), 21 (*Pantoea agglomerans*), IIS15a (*Bacillus cereus*), IIS9b (*Bacillus subtilis*), 31 (*Bacillus simplex*), IIIS10 (*Bacillus subtilis*), IIIS4 (*Bacillus megaterium*) y IIIS5 (*Bacillus simplex*).

Los resultados del cuadro 9 permitieron calcular el número de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ mL) en cada etapa del proceso de formación de la biopelícula para la fase 1 y 2. Gráficamente estos resultados pueden ser vistos en la figura 29 donde se representan las cepas de más alto valor de UFC tanto para el crecimiento total (Figuras 29

A y B) como para los microorganismos adheridos o que realmente formaron biopelículas (Figuras 29 C y D) para las fases antes mencionadas. Los tres aislados crecen con el reiniciar de la incubación a nivel de microplaca, sin embargo este crecimiento está en dependencia del tipo de microorganismos de que se trate y no es aprovechado de la misma manera en el tiempo por los diferentes aislados. De esta forma un mayor tiempo de incubación en microplaca favorecerá fundamentalmente al aislado IS16 (*Bacillus subtilis*), el cual reporta el mayor número de UFC /mL a las 48 horas. Los demás aislados aunque en sentido general se ven favorecidos, no lo hacen en la misma proporción.

Aproximadamente el 84 % de las cepas que forman biopelículas a las 24 horas, aparecen siempre formando biopelículas a las 48 horas (excepto la cepa IS4); esto confirma el planteamiento que se requieren más de 24 horas para que se formen biopelículas para la mayoría de las cepas en estudio. Finalmente, la lectura de la absorbancia para cuantificar la biopelícula formada, arroja que las 3 mejores cepas formadoras de biopelículas a las 48 horas fueron: IS16 (*Bacillus subtilis*), IIS15a (*Bacillus cereus*) y IIS9b (*Bacillus subtilis*) (resultados mostrados en Cuadro 9 y Figura 29).

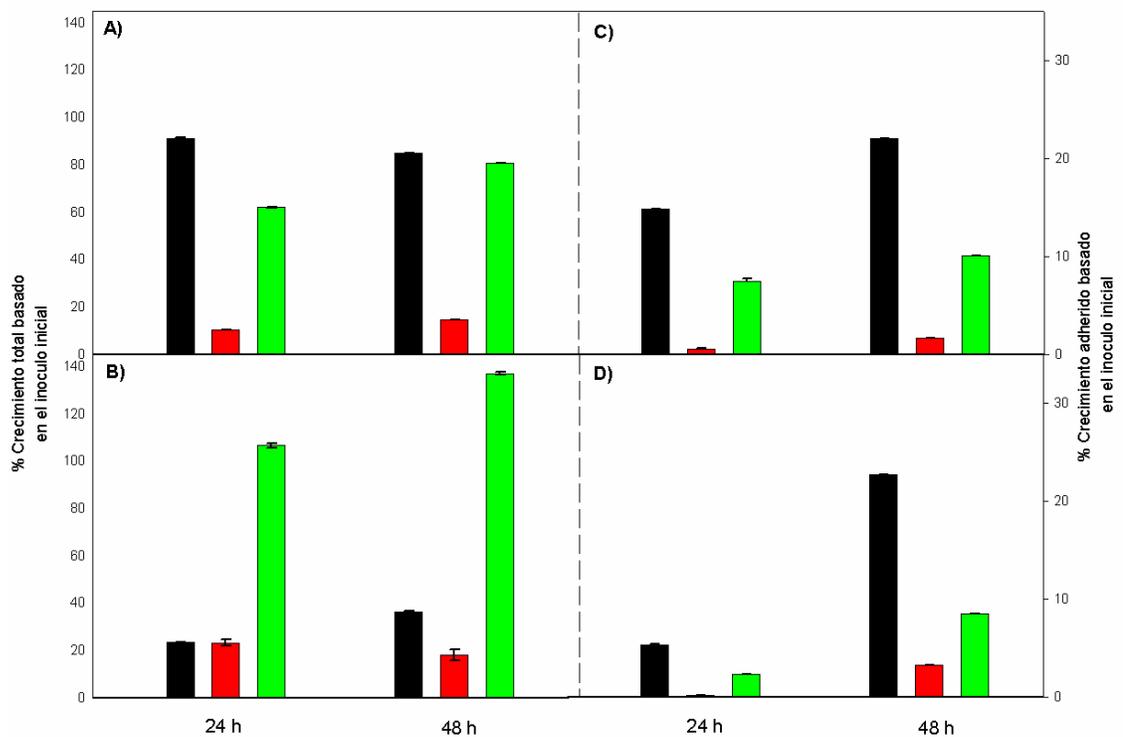


Figura 29. Proceso de formación de biopelícula. (A y C) Fase 1 (Sin glucosa). Crecimiento total (A) y adherido (C) formando biopelículas a las 24 y 48 h. (B y D) Fase 2 (con 0.1% de glucosa). Crecimiento total (B) y adherido (D) formando biopelículas a las 24 y 48 h. Los datos son resultado de la relación entre el crecimiento inicial de 6.36×10^7 , 42.60×10^7 y 6.56×10^7 UCF/ml para las cepas IS16 (■), IIS15a (■) y IIS10 (■) y sus crecimientos a las 24 y 48h, respectivamente.

Debido a que se tiene conocimiento de que la adición de azúcares (por ejemplo glucosa), incrementa la cantidad de células que forman biopelículas; se decidió realizar una segunda fase experimental pero esta vez suplementando el medio LB con glucosa al 1 %. Los resultados de esta fase experimental se muestran a continuación:

7.7.2 Fase 2. Segundo ensayo para la formación de biopelículas

Debido a que nuestro objetivo fue identificar cepas formadoras de biopelículas, sin cuantificar ningún parámetro en particular para la formación de la misma, en esta fase se siguió el mismo procedimiento descrito para la fase 1 pero en esta ocasión al medio LB se le adicionó glucosa al 1 %. Las cepas de trabajo seleccionadas fueron IS16, IIS15a y IIS10, que resultaron ser las mejores cepas en cuanto a formar biopelículas en la fase 1, los resultados obtenidos se muestran en la figura 29 B y D, además de la figura 30.

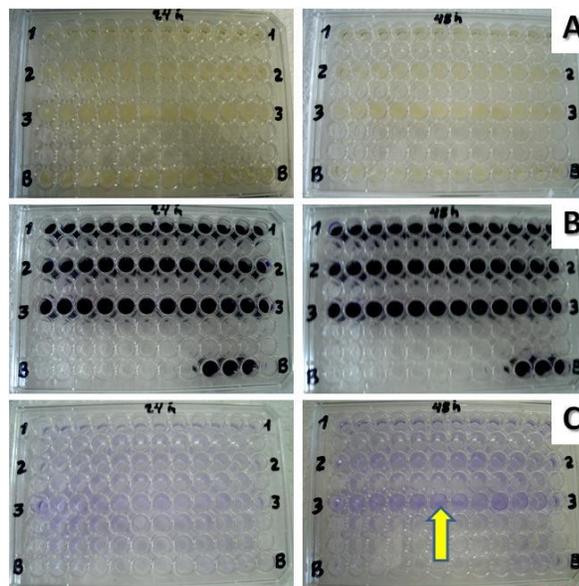


Figura 30. Proceso de formación de biopelícula en fase 2, para las cepas 1. IS16, 2. IIS15a y 3. IIS10 a 24 y 48 horas respectivamente. (A) Recién retiradas de incubación. (B) Durante el teñido con cristal violeta. (C) Cepas que forman biopelícula. La flecha muestra la coloración que indica la formación de la biopelícula.

Como se puede ver tanto a 24 como a 48 horas se da la formación de la biopelícula por parte de las tres cepas que antes fueron definidas como las mejores formadoras de biopelículas en la fase 1, por tanto el cuantificar estos valores de absorbancia en los

diferentes momentos del proceso y la determinación del número de unidades formadoras de colonias en la biopelícula, nos permitirá comparar los resultados obtenidos sin adición de glucosa (fase 1) y con adición de esta (fase 2) (Cuadro 9 y figura 29).

Los resultados muestran (Figura 29B y 30) que en las tres cepas en estudio se alcanza la formación de biopelículas destacándose en todo momento la cepa IIS10 en cuanto a crecimiento en general o total, por ser la que más altos valores reportó de DO_{540nm} : siendo al inicio en tubo 1.278 al igual que la cepa IIS15a y ambas muy por encima de la cepa IS16 que fue de 0.135; en microplaca a las 24 horas fue de 1.052 muy por encima de ambas cepas IIS15a y IS16 que ni siquiera alcanzaron el 0.5 y finalmente en el biofilm 0.023 y 0.084 a 24 y 48 horas respectivamente, muy por encima de las restantes cepas.

El análisis de estos resultados permiten comprobar que sí se produce un incremento del crecimiento de los microorganismos y que por ende podríamos esperar que aumente la formación de la biopelícula, tal y como lo indica la literatura citada, pero esto en nuestro caso no se comportó de esa forma ya que al comparar ambas fases con valores normalizados, se puede ver que el comportamiento para la adherencia es similar tanto para la adición de azúcares (Figura 29 D) como cuando no se hace ninguna adición (Figura 29 C). Si se comparan los resultados de ambas fases a 24 horas, este aumento no se ve reflejado de igual manera, por lo que parece indicar que con la adición de azúcar el tiempo de incubación pasa a ser un factor determinante en el crecimiento de los microorganismos en general.

7.8 Cinética de crecimiento microbiano

Con el propósito de recabar información acerca de la cinética de crecimiento bacteriano se realizó un experimento en el cual se tomaron las tres cepas que aportaron mejores resultados en cuanto a la formación de biopelícula (cepas IS16, IIS15a y IIS10). Estas cepas fueron puestas a crecer en condiciones tales como fue detallado en la metodología experimental y siguiendo en el tiempo la evolución de los cultivos mostrados en la Figura 31.

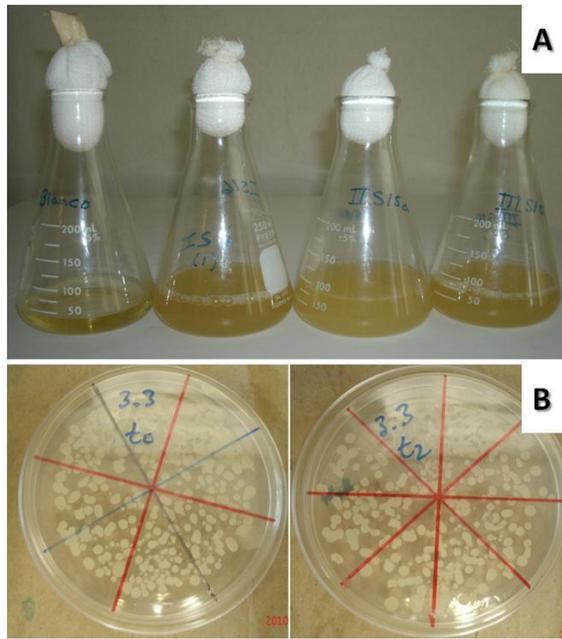


Figura 31. Cultivos tal y como fueron puestos en agitación y de los cuales se tomaba muestras en el tiempo (A) para medir su absorbancia a la vez que se dispersaban en placas de Petri con medio agar LB por triplicado y se contabilizaba el número de unidades formadoras de colonias, UFC/mL (B).

Los resultados cinéticos de la absorbancia para cada una de las cepas en el tiempo se muestran mediante el siguiente cuadro 10.

Cuadro 10. Valores de absorbancia leídos en el tiempo (h) durante 24 horas para cada una de las cepas en estudio (IS16, IIS15a y IIS10).

t (h)	IS16 (A_{540nm})	IIS15a (A_{540nm})	IIS10 ($A_{540 nm}$)
0	0.037	0.25	0.033
2	0.005	0.591	0.007
4	0.022	1.309	0.048
6	0.239	2.47	0.367
8	1.002	3.05	1.034
10	1.3	3.43	1.2
12	1.62	3.6	1.34
14	1.8	3.85	1.7
16	2.13	4.9	1.99
18	2.35	5.58	2.35
20	2.61	5.9	2.56
22	2.55	6	2.75
24	2.44	5.42	2.87

Los resultados del cuadro anterior, nos permiten observar que la cepa IIS15a se mantuvo creciendo todo el tiempo hasta las 18 horas aproximadamente, a partir de este tiempo y hasta las 22 horas se observa su fase estacionaria de crecimiento y a partir de las 22 horas se observa que entra en fase de desaceleración o muerte. A diferencia de las cepas IS16 y IIS10, en las cuales es posible observar una fase Lag en las primeras 6 horas del cultivo, la cepa IIS15a prácticamente no muestra fase Lag en esta etapa del cultivo a nivel de agitación en erlenmeyer, pero si entre 18 y 20 horas parece que entran a fase estacionaria a semejanza de la cepa IIS15a y a las 24 horas (tiempo en se detuvo el experimento) estas aun continuaban en fase estacionaria a diferencia de la cepa IIS15a la cual ya se muestra en fase de descenso

La Figura 32 nos muestra los valores de unidades formadoras de colonias (UFC/mL) contadas por medio de las placas para cada uno de los tiempos en los cuales se leyó la absorbancia correspondientes a cada uno de los aislados en análisis. Esto nos permite tener una idea de cómo avanza realmente el crecimiento celular para cada cultivo en el tiempo y finalmente establecer una curva de calibración que bien podría servir de base para posteriores corridas cinéticas a nivel de reactor. En esta figura puede observarse la superioridad en el crecimiento y multiplicación que muestra la cepa IIS15a.

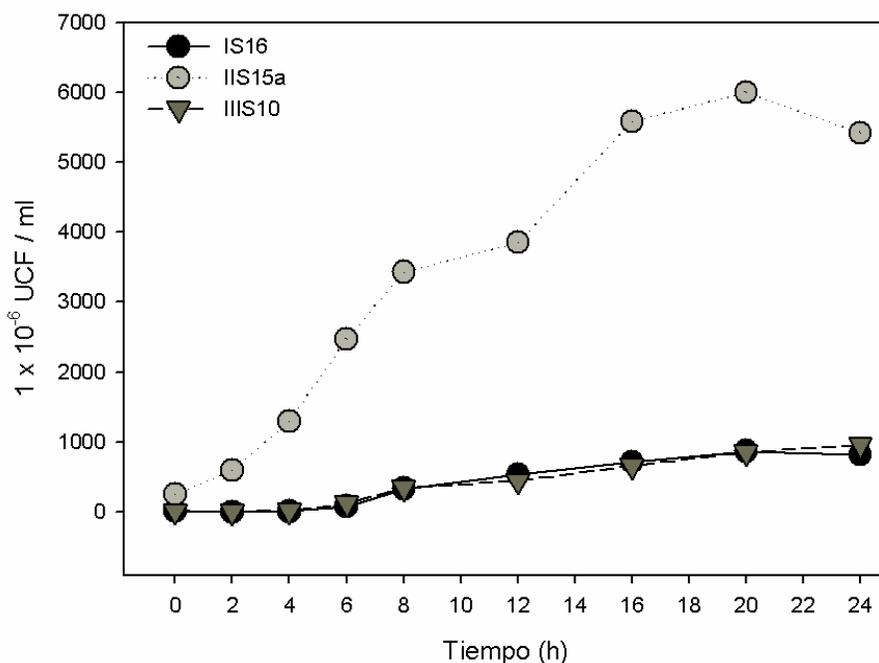


Figura 32. Cineticas de unidades formadoras de colonias (UFC/mL) vs tiempo (h) para las cepas IS16 (●), IIS15a (○) y IIS10 (▼) que son las que mejores resultados reportaron en cuanto a este parámetro.

La Figura 32 nos muestra como la cepa IIS15a tiene un crecimiento acelerado hasta cercano a las 20 horas y en la misma no se observa la fase de adaptación al cultivo. Esta misma cepa tiene una fase estacionaria muy corta y rápidamente entra en fase de desaceleración. Las cepas IS16 y IIS10 tienen comportamientos muy similares en su cinética, mostrando una fase de adaptación cercana a las 6 horas a partir de la cual entran en fase exponencial o de aceleración y permanecen así hasta cercanas las 20 horas, a partir de la cual entran en fase estacionaria, mostrando permanecer más tiempo en esta fase que la cepa IIS15a.

La curva de calibración para cada una de las cepas en estudio, fue posible obtenerla mediante la agrupación de los datos de absorbancia y los datos de UFC/mL para todo el proceso cinético durante las 24 horas, tal y como se muestra en el siguiente cuadro.

Cuadro 11. Valores de absorbancias a 540 nm y valores de UFC/mL a partir de los cuales se construyen las curvas de calibración.

IS16	IIS15a	IIS10	IS16	IIS15a	IIS10
A_{540nm}			1×10^{-6} UFC/mL		
0.037	0.25	0.033	12.3	250	11
0.005	0.591	0.007	1.66	591	2.33
0.022	1.309	0.048	7.66	1300	16
0.239	2.47	0.367	79.6	2470	122
1.002	3.43	1.034	334	3430	343
1.62	3.85	1.34	540	3850	446
2.13	5.58	1.99	710	5580	663
2.61	6	2.56	870	6000	853
2.44	5.42	2.87	813	5420	956

En el cuadro anterior se resume la información obtenida durante el proceso cinético a nivel de erlenmeyer agitado: El poder contar con los valores de absorbancia para un conjunto de tiempos y un valor UFC/mL correspondiente nos permitió preparar curvas, llamadas curvas de calibración. Estas curvas de calibración, son básicas para el momento en que se desee continuar con el proceso de escalado a fin de obtener mayores volúmenes de biomasa para los organismos estudiados.

De aquí que las curvas de calibración para cada una de las cepas se muestran a continuación (Figura 33):

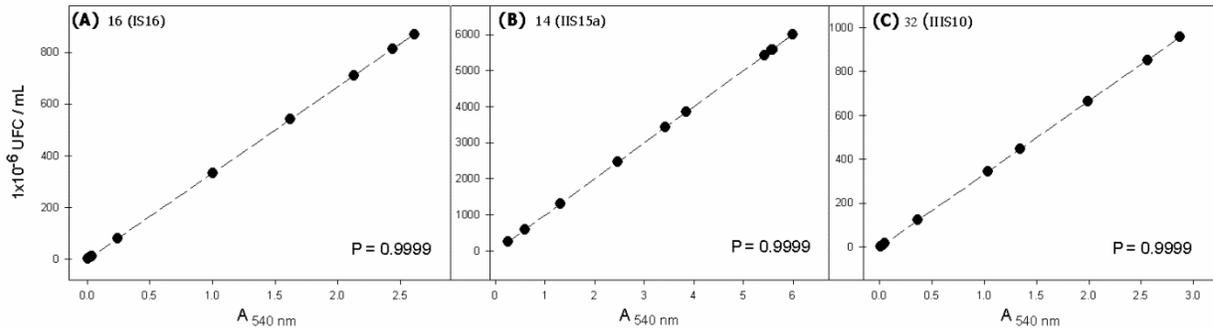


Figura 33. Curvas de calibración (UFC/mL) vs Absorbancia para las cepas IS16 (A), IIS15a (B) y IIS10 (C) obtenidas en condiciones de Erlenmeyer con agitación. Los coeficientes de correlación (P) son mostrados en las esquinas inferiores derechas.

Trabajos posteriores que impliquen la multiplicación masiva a nivel de reactor de las cepas mencionadas, deberán considerar estas curvas de calibración como punto de partida para iniciar el proceso de escalado de la producción de estas bacterias.

7.9 Bioprecipitación de carbonatos de calcio

Para dar inicio a la bioprecipitación de cristales de carbonatos de calcio, se llevó a cabo la prueba de Ureasa para cada una de las 12 cepas que dieron buenos resultados en general en el proceso de producción de biopelículas (tanto a las 24 como a las 48 horas), esto por supuesto incluye a las tres cepas que dieron mejores resultados en cuanto a formación de biopelículas dentro de ellas.

Los resultados de la prueba de ureasa se muestran a continuación:

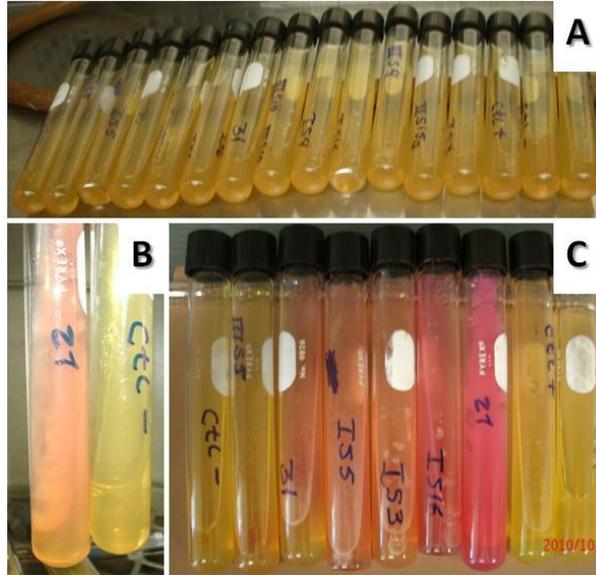


Figura 34. Composición fotográfica mostrando las diferentes tonalidades reesultantes de la prueba de ureasa. (A) Tubos con medio LB recién inoculados. (B) A las 16 horas de incubación. (C) Los cultivos que a los cinco días de incubación ya presentan actividad de ureasa.

De la Figura 34B, vemos que la cepa 21 (*Pantoea agglomerans*) a las 16 horas de incubación ya mostraba la presencia de ureasa y otras como IS16, IIS5, IS3 y IS5 lo hacen hasta los cinco días de incubación (34C). La cepa que antes mostró ser positiva a la ureasa a las 16 horas, se puede ver que ha liberado mucha más ureasa ya a los cinco días (34C). La Figura 35 por su parte, nos muestra que las mismas cepas que antes ya habían liberado ureasa son las mismas que aparecen reportadas a los ocho días, pero con mucha más liberación de esta enzima 35(B). Esta misma Figura se muestra que a los ocho días, las que ya no habían virado positivamente a la ureasa se agrupan en dos partes: Las que crecieron en el medio y dan negativas a la producción de ureasa (35C) y las que no crecieron en el medio de trabajo (35D).

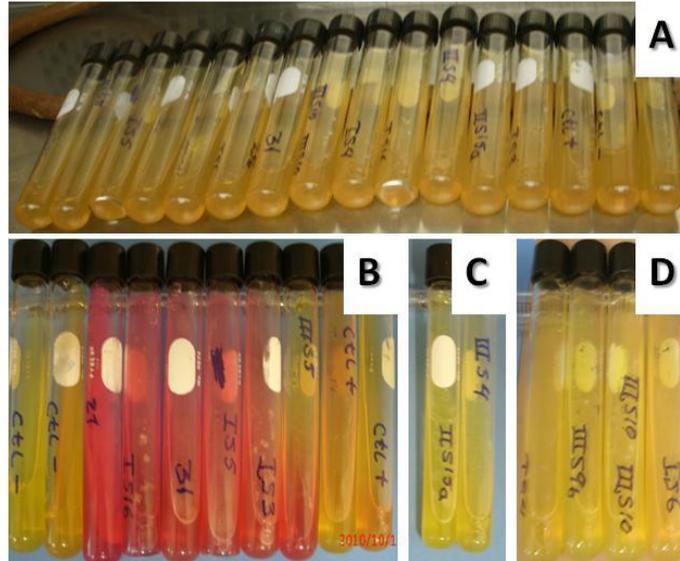


Figura 35. Resultados finales de la prueba de ureasa. A. Tubos con medio LB recién inoculados. B. A los ocho días de incubación. C. Cultivos que crecen en el medio pero que no muestran presencia de ureasa a los ocho días de incubación. D. Cultivos que no crecieron a los 8 días de inoculación.

Paralelamente al desarrollo de la prueba de ureasa, se desarrolló el experimento de bioprecipitación de cristales de carbonato de calcio con los mismos aislados para cada experimento en particular. Cada cepa fue inoculada por quintuplicado en placas de agar LB suplementadas con carbonato de calcio al 0.2 % y a cada cepa se agregaron controles que consistieron en placas LB con carbonato de calcio pero sin microorganismos.

Los resultados observados en un microscopio Nikon Eclipse E200 con un objetivo de 10X a partir del tercer día se muestran en las Figuras 36 a la Figura 38. En el apéndice B se amplían estos resultados (Figuras 50 a la 52). La figura 36 muestra los resultados obtenidos para las 3 mejores cepas en cuanto a formar biopelículas, en tanto que las Figuras 37 y 38, nos muestran los resultados para las 5 cepas seleccionadas como las mejores bioprecipitadoras de carbonato de calcio, por la cantidad precipitada de estos cristales y que se pudieron apreciar durante la cosecha de los mismos.

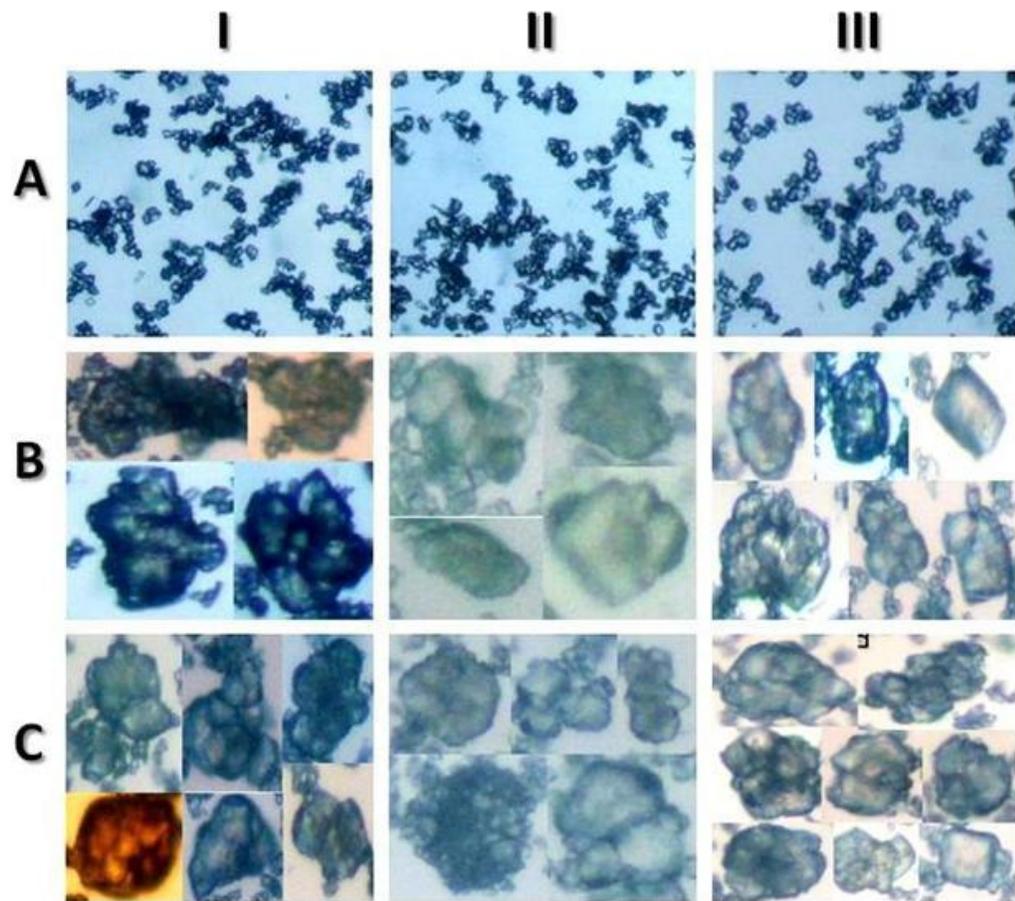


Figura 36. Cristales de carbonato de calcio a los 15 y 22 días respectivamente para los mejores formadores de biopelículas. AI. Control sin inocular, BI y CI, Cepa IS16 (*Bacillus subtilis*) a los 15y 22 días; AII. Control sin inocular, BII y CII. Cepa IIS15a (*Bacillus cereus*) a los 15 y 22 días; AIII. Control sin inocular, BIII y CIII. Cepa IIS10 (*Bacillus subtilis*) a los 15 y 22.

La figura anterior nos muestra los cristales de carbonato de calcio para las tres cepas que mejor formaron biopelículas, en ella se puede ver la presencia de cristales de diferentes colores y tamaños, además de que no pudo verse diferencia aparente entre los resultados de los cristales a los 15 días y a los 22 días respectivamente, tiempo en que se decidió detener el desarrollo del experimento.

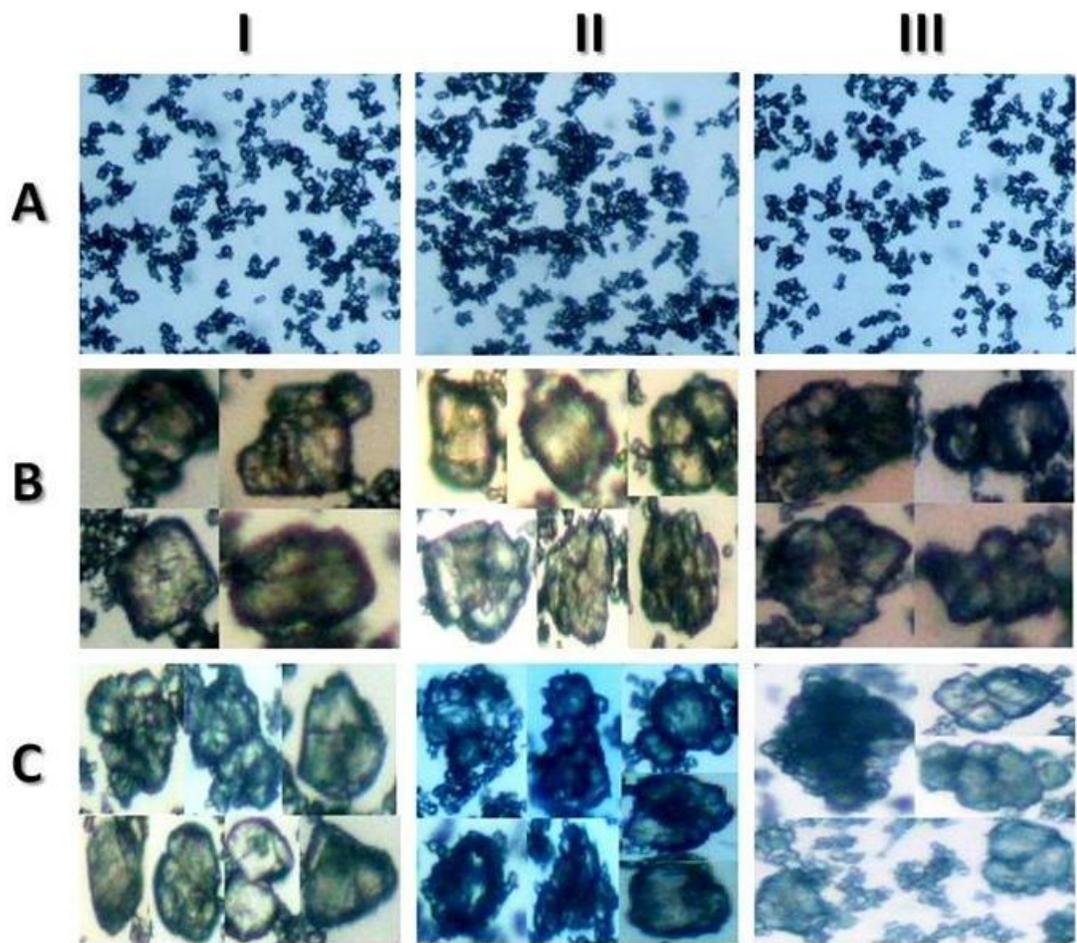


Figura 37. Cristales de carbonato de calcio a los 15 y 22 días respectivamente para las cepas que aportaron los mejores resultados en bioprecipitación. AI. Control sin inocular, BI y CI. Cepa IIS4 (*Bacillus megaterium*) a los 15 y 22 días, AII. Control sin inocular, BII y CII. Cepa IIS5 (*Bacillus simplex*) a los 15 y 22 días, AIII. Control sin inocular, BIII y CIII. Cepa IIS9b (*Bacillus subtilis*) a los 15 y 22 días.

Las Figuras 37 y 38 muestran los cristales obtenidos por parte de las 5 mejores cepas en cuanto a bioprecipitar los mismos. La selección como mejores bioprecipitadoras, se hizo en base a la observación visual de la cantidad de cristales que se logró recolectar de cada una de ellas después de la cosecha. Cristales y tamaños diferentes fueron observados, sin diferencia visual apreciable a los 15 y 22 días respectivamente. La cosecha de los cristales de carbonato de calcio, previo a ser enviados a realizarle análisis de microscopía electrónica de barrido y de difracción de rayos X, se realizó tal y como se mostró en la metodología experimental en la Figura 7.

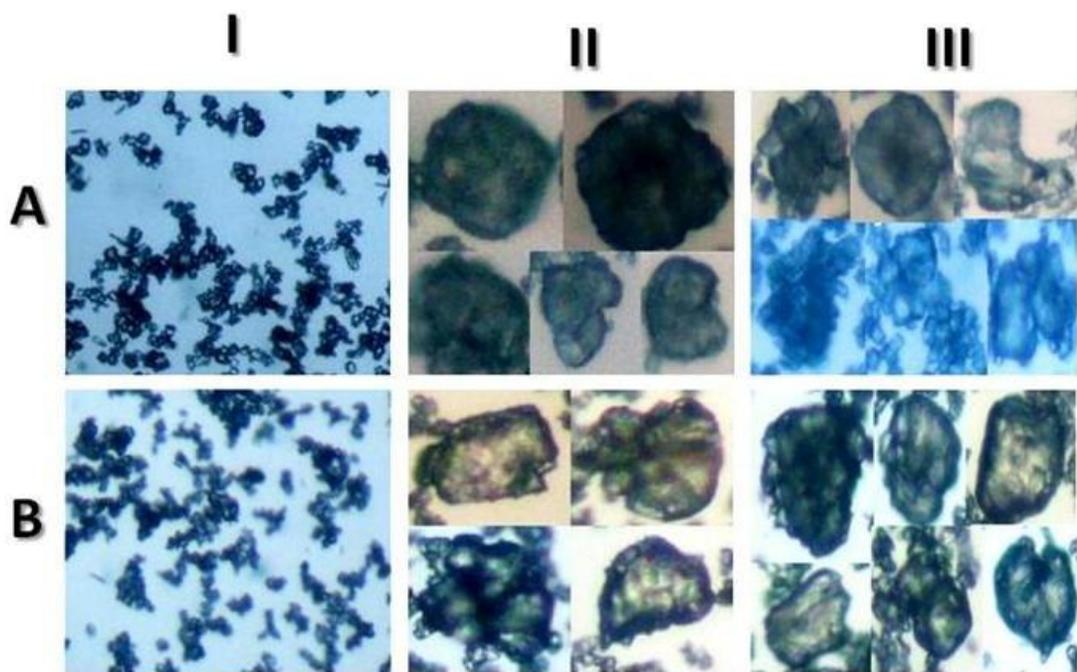


Figura 38. Cristales de carbonato de calcio a los 15 y 22 días respectivamente para las cepas que aportaron los mejores resultados en bioprecipitación. AI. Control sin inocular, AII y AIII. Cepa IS5 (*Bacillus subtilis*) a los 15 y 22 días; BI. Control sin inocular, BII y BIII. Cepa 21 (*Pantoea agglomerans*) a los 15 y 22 días.

7.10 Difracción de rayos X y microscopia electrónica de barrido de los aislamientos formadores de biopelículas y bioprecipitadores de cristales de carbonato de calcio

La Figura 39 muestra los resultados de microscopia electrónica de barrido para las cepas que resultaron buenas formadoras de biopelículas y que a su vez resultaron ser las mejores en cuanto a bioprecipitación de cristales de carbonato de calcio. Podemos ver cristales de diferentes morfologías (cilíndricas y romboédricas), pero predominantemente se observan cristales de tipo romboédrico, que son característicos de la calcita. Otras morfologías que se observan en menor cuantía, indican la presencia de otros tipos de cristalografía diferente a la calcita. La figura 39F, es una muestra importante que nos señala como las bacterias son las responsables del proceso de bioprecipitación de cristales de carbonato de calcio, ya sea siendo el centro de enucleación o por otros mecanismos que han sido mencionados en la literatura.

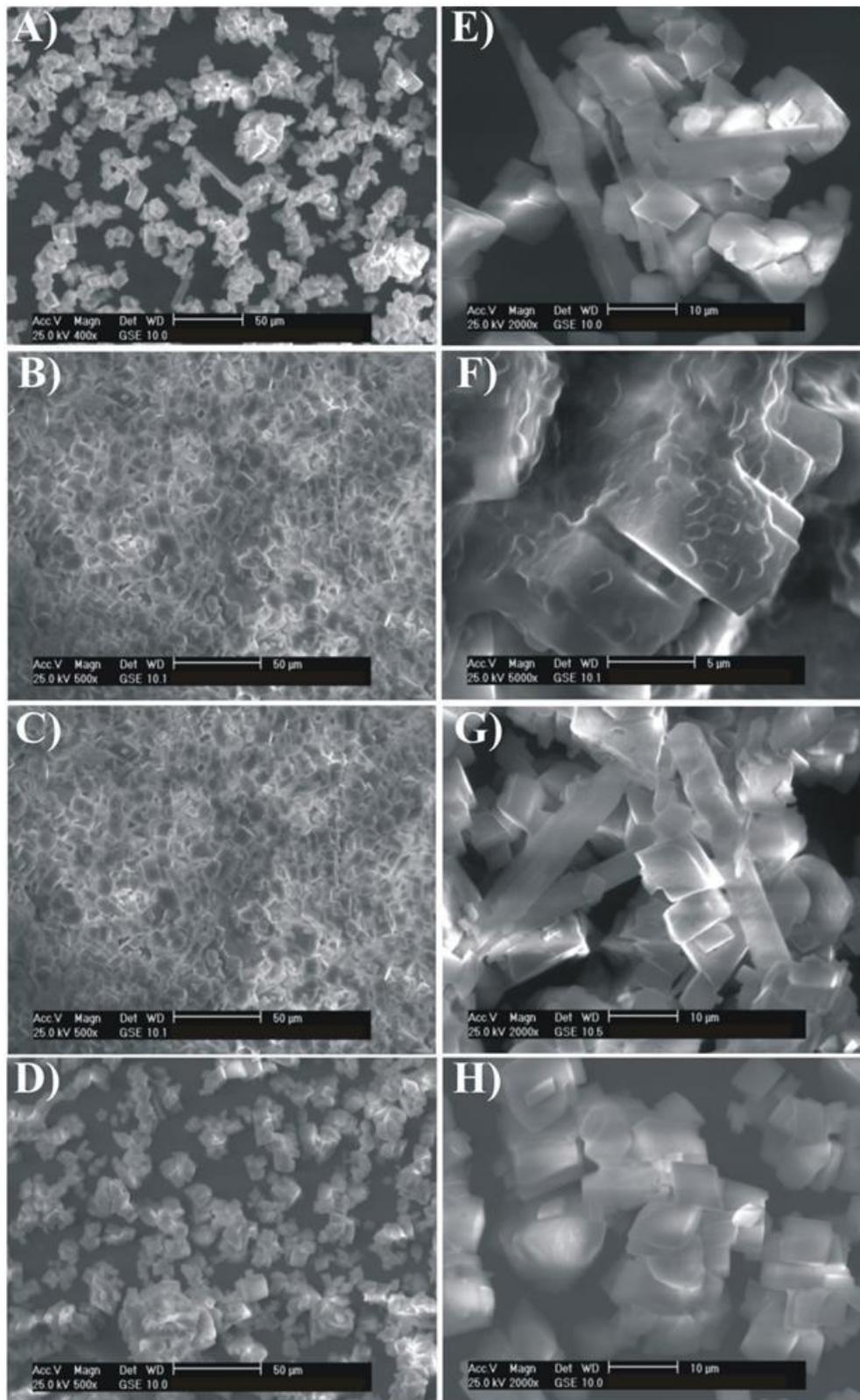


Figura 39. Micrografía electrónica de barrido (ESM) de cristales obtenidos a partir de bacterias con altos potenciales biotecnológicos. (A y E) *Bacillus subtilis* LBI28, (B y F) *Bacillus subtilis* LBI15, (C y G) *Bacillus subtilis* LBI35, y (D y H) *Pantoea agglomerans* LBIR. Composición izquierda: Morfología

comparativa de cristales (escala a 50 μm). Composición derecha: Detalles de cristales cilíndricos y rombohedricos (E), células bacterianas sobre cristals rombohedricos (F), Detalles de cristales cilindrios y rombohedricos (G), Detalles de cristales rombohedricos (H).

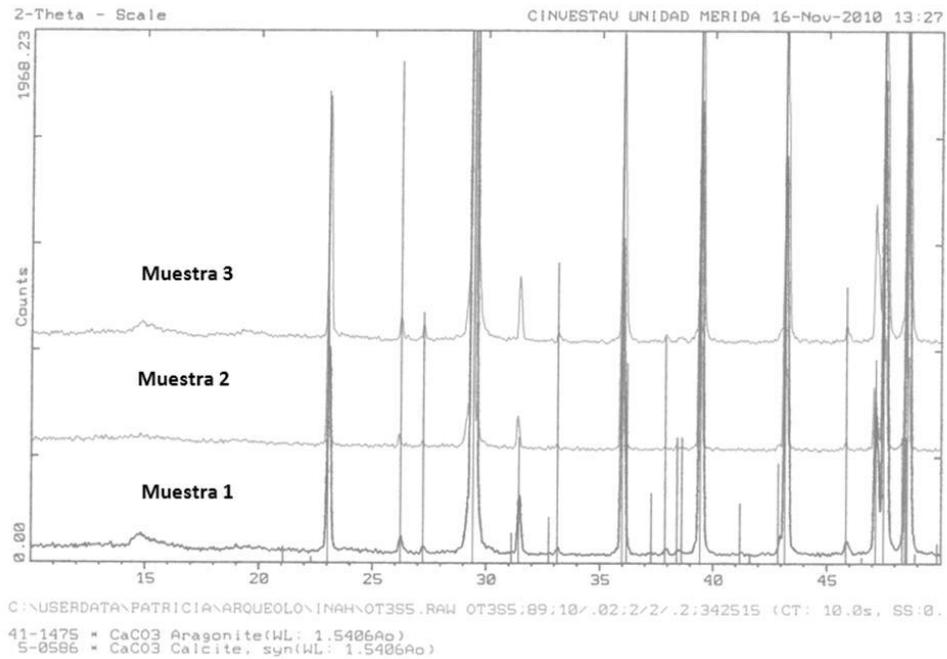


Figura 40. Espectrograma para las cepas 31, IIS5 (muestras 1 y 2; *Bacillus simplex*), y IS5 (muestra 3, *Bacillus subtilis*).

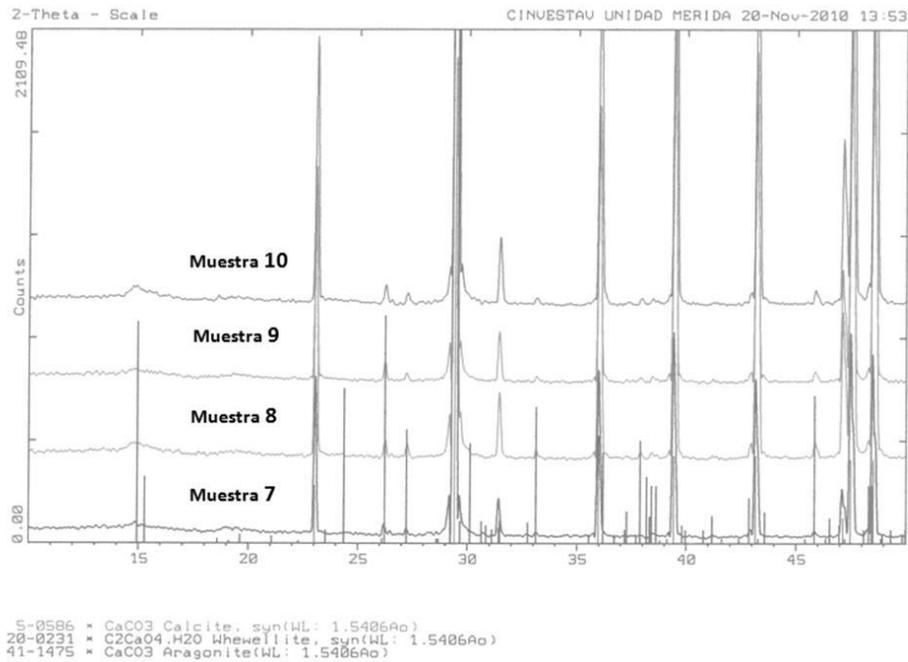


Figura 41. Espectrograma para las cepas IS16, IS3, IS4 (muestras 7, 9, y 10; *Bacillus subtilis*) y IIS2 (muestra 8, *Bacillus cereus*).

Los análisis cristalográficos a partir de los cuales se obtuvieron las Figuras 40 y 41, muestran los espectrogramas correspondientes a cada uno de los tipos de minerales a que corresponden los cristales bioprecipitados por las bacterias en estudio. De esta forma, mediante su lectura y análisis, nos es posible determinar el tipo de cristal y la cantidad porcentual de cada uno de ellos en la muestra. Resultados que nos serán de gran valor para poder inferir la utilidad o aplicación que estos tipos de cristales podrían tener en un futuro mediato en que se trabaje en su aplicación práctica.

A continuación se presenta un cuadro resumen de toda la información relevante para el caso de las bacterias, desde su identificación, su capacidad de producir biopelícula y ureasa, la bioprecipitación de cristales de carbonato de calcio y el tipo de cristal bioprecipitado, para finalmente ubicarnos en el tipo de biopelícula a partir de la cual fue aislado un microorganismo determinado.

Cuadro 12. Características bioquímicas y de formación de cristales de los aislamientos formadores de biopelículas a las 24 y 48 horas en microplacas.

Código	Identidad	Formación de biopelícula (UFC/mL)	Actividad de ureasa (h)	Bioprecipitación de CaCO ₃ (%)			Muestra		
				Calcita	Aragonita	Whewellite	I	II	III
IS4	<i>Bacillus subtilis</i>	1.3 E08 ± 0.0971 *	SCEM	99.17	0.63	0.20	X		
IS5	<i>B. subtilis</i>	4.8 E07 ± 0.0388 **	5 días	99.15	0.69	0.16	X		
IIS9b	<i>B. subtilis</i>	5.2 E08 ± 0.1186 **	BCEM	98.97	0.74	0.29			X
IS3	<i>B. subtilis</i>	6.6 E07 ± 0.0397 **	48 horas	99.27	0.73	0.0	X		
IIS10	<i>B. subtilis</i>	4.9 E07 ± 0.2157 *	BCEM	99.49	0.41	0.1			X
IS16	<i>B. subtilis</i>	9.4 E07 ± 0.2143 *	48 horas	99.49	0.51	0.0	X		
IIS17	<i>B. cereus</i>	ND	ND	ND	ND	ND		X	
IIS15a	<i>B. cereus</i>	2.34E07 ± 0.0636 *	BCEM	99.26	0.59	0.15		X	
IIS9a	<i>B. cereus</i>	ND	ND	ND	ND	ND			X
IS12	<i>B. cereus</i>	ND	ND	ND	ND	ND	X		
IIS5	<i>B. simplex</i>	1.0 E07 ± 0.0368 *	5 días	99.01	0.99	0.0			X
32	<i>B. simplex</i>	ND	ND	ND	ND	ND			X
IIS12	<i>B. simplex</i>	ND	ND	ND	ND	ND		X	
IIS5	<i>B. simplex</i>	ND	ND	ND	ND	ND			X
IIS3	<i>B. simplex</i>	ND	ND	ND	ND	ND		X	
31	<i>B. simplex</i>	4.8 E07 ± 0.0388 **	5 días	99.12	0.60	0.28			X
IIS9	<i>B. pumilus</i>	ND	ND	ND	ND	ND		X	
IIS2	<i>B. pumilus</i>	ND	ND	ND	ND	ND		X	
IIS10	<i>B. pumilus</i>	ND	ND	ND	ND	ND		X	
IS8	<i>B. pumilus</i>	ND	ND	ND	ND	ND	X		
IIS4	<i>B. megaterium</i>	2.2 E07 ± 0.007 *	BCEM	99.35	0.55	0.1			X
IIS1	<i>B. psychrodurans</i>	ND	ND	ND	ND	ND		X	
IIS9	<i>Arthrobacter</i> sp.	ND	ND	ND	ND	ND			X
IS2	<i>Arthrobacter</i> sp.	ND	ND	ND	ND	ND	X		
IS6	<i>Pantoea agglomerans</i>	1.1 E07 ± 0.0024 **	SCEM	99.13	0.67	0.20	X		
21	<i>P. agglomerans</i>	2.0 E07 ± 0.0029 **	16 horas	99.5	0.34	0.16		X	

IIS4	<i>P.agglomerans</i>	ND	ND	ND	ND	ND	X
27	<i>Stenotrophomonas</i>	ND	ND	ND	ND	ND	X
	sp.						
IS17a	<i>Pseudomonas</i> sp	ND	ND	ND	ND	ND	X
IS1	<i>Pseudomonas</i> sp.	ND	ND	ND	ND	ND	X
IS17	<i>Pseudomonas</i> sp.	ND	ND	ND	ND	ND	X

ND. No determinadas. Al no formar biopelículas o no ser apreciables cuantitativamente, no se consideraron para los restantes experimentos.

*. Mejores aislados en cuanto a formar biopelículas a las 24 horas en microplaca.

**. Mejores aislados en cuanto a formar biopelículas a las 48 horas en microplaca.

BCEM. Buen crecimiento en el medio sin cambio de coloración a los 8 días.

SCEM. No se observó crecimiento en el medio utilizado a los ocho días de incubación.

Los resultados de la microscopia electrónica de barrido para las cepas que aportaron los mejores resultados en cuanto a formar biopelículas y que a su vez resultaron ser las mejores bioprecipitadoras (Figura 39) muestran cristales de diferentes morfologías, coincidiendo esta observación con lo señalado cuando se analizaron los cristales por microscopia de luz (Figuras 36-38). Los análisis de difracción de rayos X (Figuras 40 y 41; Cuadro 12), nos indican que los cristales vistos en la Figura 39 (por microscopia electrónica de barrido), y Figuras 36 a 38 por microscopia de luz, básicamente corresponden a cristales de calcita (CaCO_3) y aragonita (CaCO_3) y en menor proporción a whewellita ($\text{CaCO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$). La cepa IS16 (*Bacillus subtilis*) no presenta cristales de whewellita, mientras que las cepas IIS15a (*Bacillus cereus*) y IIS10 (*Bacillus subtilis*) presentan 0.15 y 0.1 % respectivamente de este tipo de cristales. Los contenidos de aragonita son cercanos al 0.5 % para todos estos aislados, mientras que los contenidos de calcita son superiores al 99 % en todos los casos, con una ligera disminución para el aislado de la cepa IIS15a. Para las cepas que resultaron ser las mejores bioprecipitadoras, estas son las cepas [IIS4 (*Bacillus megaterium*), IIS5 (*Bacillus simplex*), IIS9b (*Bacillus subtilis*), 21 (*Pantoea agglomerans*) e IS5 (*Bacillus subtilis*)], al igual que para las cepas antes descritas, básicamente están constituidas por cristales del mismo tipo como son: calcita, aragonita y whewellita. Para estas últimas el contenido de calcita es ligeramente superior al 99 % para todos los casos, salvo para la cepa IIS9b (*Bacillus subtilis*) que resultó ligeramente inferior al 99 % (Cuadro 12). Los contenidos de aragonita resultaron ser variables entre 0.99 % para la cepa IIS5 (*Bacillus simplex*) y 0.34 % para la cepa 21 (*Pantoea agglomerans*). En cuanto al contenido de whewellita, la cepa IIS5 (*Bacillus simplex*) al igual que la cepa IS16 (*Bacillus subtilis*) no producen cristales de este tipo y los restantes aislados produjeron whewellita en porcentajes que estuvieron entre 0.1 % para la cepa IIS4 (*Bacillus megaterium*) y 0.29 % para la cepa IIS9b (*Bacillus subtilis*).

Del análisis de los resultados de difracción de rayos X que se pueden ver en el cuadro 12, se deduce que tanto para el proceso de formación de biopelículas, como para el proceso de bioprecipitación de cristales de carbonato de calcio predominan fundamentalmente los aislados del tipo *Bacillus subtilis*. Resulta interesante destacar que en todos los casos, salvo en uno de ellos (IIS9b), se producen cantidades superiores al 99 % de calcita, todos los aislados que se presentan en este cuadro (y que se probaron para la bioprecipitación) producen Aragonita y lo hacen en cantidades que oscilan entre el 0.4 % y el 0.99 %. Finalmente todos estos aislados producen también whewellita, salvo los aislados IS16 y IIS5, en cantidades que oscilan entre 0.1 y 0.29 %. Del total de aislados presentados en este cuadro, en sentido general la distribución cuantitativa de los mismos es bastante similar para las diferentes biopelículas analizadas, aunque ligeramente predominan en las biopelículas de los puntos I y II. Según las especies encontradas, predominan *Bacillus* del tipo *subtilis* y *simplex*, *Pantoeas* y *Pseudomonas* tienen la misma presencia cuantitativamente, así como *B. megaterium*, *B. psychrodurans* y *Stenotrophomonas* están presentes en igual proporción cuantitativa, aunque en sentido general, estos últimos son de los más escasos en las biopelículas analizadas.

7.11. Posible participación de las especies aisladas en procesos de biodeterioro y/o potencial para el desarrollo de futuros procesos biotecnológicos

El análisis de los resultados alcanzados en este trabajo a la luz de lo que ha sido reportado en la literatura, con vistas a determinar la posible participación de los aislados encontrados en procesos de biodeterioro y/o determinar su potencial en el desarrollo de futuros procesos biotecnológicos, llevó a obtener el siguiente cuadro:

Cuadro 13. Diversidad bacteriana aislada y su relación con el biodeterioro documentado hasta el momento.

Aislamiento	Relación con el biodeterioro
<i>Arthrobacter</i> sp.	Gorbushina <i>et al.</i> , 2004; Scheerer <i>et al.</i> , 2009
<i>B. cereus</i>	Gaylarde <i>et al.</i> , 2001; McNamara <i>et al.</i> , 2006
<i>B. megaterium</i>	
<i>Kocuria</i> sp.	Milanesi <i>et al.</i> , 2009; Cappitelli <i>et al.</i> , 2007
<i>B. pumilus</i>	Heyrman y Swinngs 2001; Prieto <i>et al.</i> , 1997.
<i>Brevundimonas</i> sp.	Suihko <i>et al.</i> , 2007
<i>Pseudomonas</i> sp.	Gaylarde <i>et al.</i> , 2001; McNamara <i>et al.</i> , 2006.

Algunos de los géneros bacterianos que han sido relacionados con el biodeterioro y que han sido detectados en este trabajo son *Arthrobacter*, *Bacillus cereus* y *Bacillus megaterium*. La presencia de estos microorganismos en las biopelículas en las cuales se observó biodeterioro (biopelículas ubicadas en el punto III), deberá ser un aspecto fundamental a tomar en cuenta para la toma de cualquier decisión futura relacionada con la preservación y conservación del monumento histórico de la cual se aislaron estos microorganismos.

Cuadro 14. Diversidad fúngica aislada y su relación con el biodeterioro documentado hasta el momento.

Aislamiento	Relación con el biodeterioro
<i>Auerobasidium pullulans</i>	Warscheid y Braams 2000; Konkol <i>et al.</i> , 2010.
<i>Aspergillus</i> sp.	Gaylarde <i>et al.</i> , 2001; Sterflinger 2000.
<i>Penicillium</i> sp.	Gorbushina <i>et al.</i> , 2004; Sterflinger 2000
<i>Trichoderma</i> sp.	Sugiyama <i>et al.</i> , 2009; Gorbushina <i>et al.</i> , 2002
<i>Cladosporium</i> sp	Gorbushina <i>et al.</i> , 2002
<i>Alternaria</i> sp.	Gorbushina <i>et al.</i> , 2002
<i>Fusarium solani</i>	Bastian <i>et al.</i> , 2010; Jurado <i>et al.</i> , 2008.

En el análisis del biodeterioro y las medidas preventivas a realizar, especial interés se habrá de tomar a la presencia de hongos como: *Aureobasidium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* y *Alternarias*. Estos géneros están muy bien caracterizados en sus mecanismos de acción durante los procesos de biodeterioro y en este trabajo fue posible localizarlos en las biopelículas en las cuales se observaron síntomas evidentes de deterioro, lo cual deberá ser una razón fundamental a considerar en la decisión de tipo de medida preventiva a aplicar.

Cuadro 15. Diversidad bacteriana aislada y su relación con su potencial biotecnológico documentado hasta el momento

Género aislado	Potencial biotecnológico	Referencia
<i>Arthrobacter</i> sp.	Tratamiento de aguas	Margesin y Schinner, 1998 Kallimanis <i>et al.</i> , 2007
	Biorremediación de suelos	
<i>Kocuria</i> sp.	Degradación de plumas de aves	Mariano <i>et al.</i> , 2007
<i>Brevundimonas</i>	Biodegradación de contaminantes	Chang <i>et al.</i> , 2010
<i>Pseudomonas</i>	Precipitación de cristales de carbonato de calcio	Zamarreño <i>et al.</i> , 2009
<i>B. megaterium</i>	Precipitación de cristales de carbonato de calcio	Lian <i>et al.</i> , 2006
<i>B. subtilis</i>	Precipitación de cristales de carbonato de calcio	Rodriguez-Navarro <i>et al.</i> , 2003; Barabesi <i>et al.</i> , 2007; Perito <i>et al.</i> , 2000; Tiano <i>et al.</i> ; 1999.
<i>B. cereus</i>	Precipitación de cristales de carbonato de calcio	Le Metayer-Levrel <i>et al.</i> , 1999

Dentro de los diversos géneros aislados se encuentran algunos que han sido mencionados como de gran importancia en diversos procesos de biorremediación y sistemas de tratamientos, de ahí que géneros como *Arthrobacter*, *Kokurias* y *Brevundimonas* seguramente podrán ser de gran utilidad para el desarrollo de sistemas de tratamiento de contaminantes diversos en un futuro. Por otra parte, otros géneros aislados como: *Pseudomonas* y varios tipos de *Bacillus*, seguramente serán de mucho valor en el momento en que se decida trabajar con sistemas biológicos de protección para los monumentos, ya que por medio de ellos se pueden desarrollar sistemas de bioprecipitación de carbonatos que ha sido bien documentada su acción protectora de los mismos.

Cuadro 16. Diversidad fúngica aislada y su relación con su potencial biotecnológico documentado hasta el momento.

Género aislado	Potencial biotecnológico	Referencia
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Producción de sideroforos, producción de lipasas, producción de exopolisacaridos	Wang, <i>et al</i> 2009; Liu <i>et al.</i> , 2008; Sing <i>et al.</i> , 2008
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Producción de lipasas	Liu <i>et al.</i> , 2008
<i>Aspergillus</i> sp.	Biodegradación; compostaje	Giraud <i>et al.</i> , 2001; Hansgate <i>et al.</i> , 2005
<i>Penicillium</i> sp.	Biodegradación; compostaje	Potin <i>et al.</i> , 2004; Hansgate <i>et al.</i> , 2005.
<i>Trichoderma</i> sp.	Remediación de suelos, producción de enzimas.	Potin <i>et al.</i> , 2004
<i>Mucor hiemalis</i>	Producción de Uricasa	Yazdi <i>et al.</i> , 2006

Aureobasidium pullulans, resulta ser uno de los aislados más interesantes dentro del grupo mencionado acá en este último cuadro ya que son muchísimos los usos potenciales que están documentados para la misma y en la mayoría de los casos se relaciona con la producción de diversos tipos de metabolitos, del mismo modo que las *Rhodotorula* han sido mencionados en la producción de varios tipos de enzimas. El disponer de aislados del género *Trichoderma*, abre una gran perspectiva de trabajo relacionado con los campos de producción de posibles biocontroladores y bioestimulantes para su uso en la agricultura. De modo que con los aislados obtenidos se abren muchos campos y nuevas perspectivas de aplicaciones biotecnológicas.

8 DISCUSIÓN

8.1 Toma de muestras

Derivado de las diferentes gestiones que se efectuaron con las autoridades del Castillo de Chapultepec (Figura 1), debido a situaciones internas del lugar solo fue posible realizar un muestreo en abril del 2009 y básicamente en superficies externas a dicho monumento. Las muestras fueron tomadas en tres diferentes puntos correspondientes a los muros y cimientos perimetrales de acceso al Castillo (puntos I y II, Figura 2C y D) y de un monumento ubicado en el patio del mismo (punto III, Figura 2 A y B) en los cuales fue posible observar diferentes tipos de biopelículas como las mostradas en las Figuras 8 A, B, C, E y F. Debido a la ubicación de los puntos de muestreo seleccionados, los mismos estaban bajo la influencia de las diferentes variables ambientales como son la humedad, la luz, la temperatura y los contaminantes propios de la ciudad de México (Parrish *et al.*, 2009).

Se ha observado que la amplia diversidad microbiana encontrada en la naturaleza puede solo parcialmente ser aislada y mantenida en laboratorio a través de una amplia gama de medios de cultivo con altos contenidos de sustancias orgánicas. Este tipo de medios ricos en nutrientes son utilizados porque promueven el crecimiento microbiano, reducen tiempos de incubación y promueven la producción de metabolitos industrialmente útiles, pero cuando se trata del estudio de comunidades microbianas ellos pueden enmascarar la distribución real de microorganismos y aislar selectivamente propagulos del aire o aquellas especies que crecen más rápidamente en vez de los microorganismos activos presentes en el ecosistema (Laiz *et al.*, 2001). Diferentes medios de cultivo enriquecidos como los citados en la metodología experimental fueron utilizados para el proceso de tomas de las muestras, tanto en estado sólido como líquido, lo cual permitió obtener el crecimiento de una gran cantidad de diversos microorganismos.

8.2 Aislamiento e identificación de hongos filamentosos

La investigación tradicional ha sido hecha usando métodos clásicos de cultivos. El aislamiento y cultivo de microorganismos es usualmente llevado a cabo por incubación de muestras del material en medios selectivos sólidos y/o líquidos. Por tanto los ensayos de cultivo requieren grandes cantidades de muestras del material, llevándonos a muchos problemas cuando trabajamos con objetos de arte. Adicionalmente los métodos clásicos son grandes consumidores de tiempo y generalmente requieren de 1 a 6 semanas para obtener el cultivo. Muchos estudios han mostrado que únicamente una muy pequeña proporción de la comunidad microbiana total puede ser obtenida (Delille, 1995; Jørgensen, y Bak, 1991; Parkes *et al.*, 1994). Aun menos del 1 % de las bacterias habitantes en un

lugar, pueden ser detectados por técnicas de cultivo estándar debido a problemas tales como: a). El uso de medios de cultivo inadecuados; b). Tiempo de incubación insuficiente; c). La falta de métodos apropiados para el cultivo de microorganismos no cultivables en condiciones de laboratorio, d). Bacterias en un estado no cultivable y e). La presencia de organismos simbióticos y/o parasíticos incapaces de crecer en medios bacteriológicos en ausencia de sus huéspedes.

Combinar métodos moleculares con ensayos clásicos de cultivo es una muy buena aproximación para caracterizar una comunidad de microorganismos en una muestra ambiental y para obtener una idea más global de la diversidad microbiana presente en los diferentes hábitats. La información filogenética obtenida con técnicas moleculares puede ser muy útil para diseñar nuevos medios de cultivos apropiados para microorganismos recién identificados (Piñar *et al.*, 2001).

En las últimas décadas, una serie de nuevas técnicas moleculares para análisis de comunidades microbianas por métodos independientes del cultivo en muestras ambientales han sido desarrolladas (Muyzer *et al.*, 1993; Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2001b). Esos métodos permiten la detección de una amplia variedad de especies microbianas que pueden ser obtenidas con análisis de cultivos convencionales y por tanto nos dan una idea más completa de la microbiota presente en una muestra determinada.

En el caso de los hongos filamentosos, la literatura sugiere que estos hongos están presentes en bajo número sobre la superficie de monumentos históricos construidos con rocas (Gaylarde *et al.*, 2001; Hirsch *et al.* 1995b; Ortega-Morales *et al.*, 2000). Poblaciones de 10^2 a 10^5 UFC / g son las más comunes (Gaylarde *et al.*, 2001; Hirsch *et al.* 1995b; Ortega-Morales *et al.*, 2000; Resende *et al.*, 1992; Urzi, 1993), sin embargo, esto no significa que estos hongos no son importantes en el biodeterioro de estos monumentos, su actividad puede ser altamente erosiva. Wollenzien *et al.*, (1995), mostraron diferentes géneros de hongos filamentosos (*Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Phoma* y *Ulocladium*) existentes sobre rocas calcáreas en el mediterráneo. Gorbuschina *et al.*, (2002), detectaron principalmente deuteromicetes tales como *Alternaria*, *Cladosporium* y *Trichoderma* sobre monumentos históricos de mármol de San Petersburgo y Moscú. Resende *et al.*, (1996), identificaron un amplio rango de hongos filamentosos sobre rocas de esteatita y cuarcita en iglesias del estado de Minas Gerais en Brasil. Los géneros más comunes que encontraron fueron *Cladosporium* y *penicillium*. Sterflinger (2000), indicó que cepas de *Aspergillus niger*, *Penicillium simplissimum* y *Scopulariopsis brevicaulis* como los hongos más importantes en el ataque de rocas silíceas. Los aislados encontrados en los alrededores del Castillo de Chapultepec, de manera general coinciden con otros que han sido reportados en la literatura antes citada y ha sido documentada la participación de los mismos en los diversos procesos de biodeterioro.

El análisis del cuadro 3, permite ver que la mayoría de géneros aislados crecen bien en medio enriquecido PDA a pH entre 5.6 y 9.6 y 30 °C, sin mayores diferencias en cuanto a crecimiento a las 96 horas de incubación. Los aislados pertenecientes al género *Cladosporium* parecen crecer un poco mejor a 7.6 de pH e iguales condiciones de

incubación. Algunos géneros como *Trichoderma*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Epicoccum* y *Pestalotiopsis*, mostraron muy buen crecimiento en PDA para todos los valores de pH analizados incluyendo 3.6. Para estos últimos géneros, inclusive a las 72 horas de incubación y a todos los valores de pH ya mostraban un máximo de crecimiento en placa de PDA. En la mayoría de los casos se observaron esporas elipsoides, con diversas tonalidades de coloración tanto en esporas como en crecimiento en placa Petri, lo cual es la razón de las diversas coloraciones que se observan en las biopelículas muestreadas.

Finalmente es importante destacar que géneros como *Trichoderma* solo se aislaron del punto II muestreado, o sea asociadas al muro perimetral y a biopelículas en las cuales se observó biomineralización, mientras que *Alternaria* se detectó en biopelículas del punto I (muro perimetral) y en el punto III (monumento en el patio del castillo). Este género ha sido asociado al daño observado en monumentos históricos (Wollenzien *et al* 1995; Gorbuschina *et al.*, 2002). *Mucor* fue aislado de los puntos II y III, mientras que *Fusarium* fue aislado de los diversos puntos muestreados. Tanto *Alternaria*, como *Mucor* y *Fusarium* han sido aislados de distintos monumentos y se ha establecido su correlación con procesos de biodeterioro (Grbic *et al.*, 2010; Wollenzien *et al* 1995; Gorbuschina *et al.*, 2002). Especial interés habrá de ponerse a los aislados del género *Fusarium*, ya que al aparecer en diferentes zonas de muestreo está especie podría estar participando en el proceso de biomineralización a la par de otros procesos relacionados con el biodeterioro tal como ha sido reportado previamente (Wollenzien *et al* 1995; Gorbuschina *et al.*, 2002). *Cladosporium* solo fue aislado del punto III, lo cual requiere atención debido a los daños que se observaron en el monumento muestrado y que este género ha sido reportado por diversos autores como participante en procesos de biodeterioro (Resende *et al.*, 1996; Wollenzien *et al.*, 1995; Gorbuschina *et al.*, 2002). Otros géneros como *Penicillium* y *Epicoccum* también fueron aislados del punto III e igualmente han sido reportados por los anteriores autores como participantes en procesos de biodeterioro y que han sido aislados en diversos monumentos históricos. Muy poco o casi nada ha sido reportado hasta ahora sobre el aislamiento de *Pestalotiopsis* de monumentos históricos, salvo de su presencia en algunas pinturas en museos, en este trabajo se logró aislar este género de la muestra tomada del monumento al interior del patio del Castillo de Chapultepec y deberá investigarse más acerca de en que puede estar participando en ese lugar.

En general, algunas especies de hongos filamentosos como: *Trichoderma*, *Alternaria*, *Mucor*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Epicoccum*, *Penicillium*, entre otros han sido reportados previamente relacionados a monumentos y estructuras históricas (Grbic *et al.*, 2010; Gaylarde *et al.*, 2001; Hirsch *et al.*, 1995b; Ortega-Morales *et al.*, 2000; Resende *et al.*, 1992; Urzi, 1993). La literatura sugiere que los hongos están presentes en bajo número sobre la superficie de monumentos históricos construidos con rocas con poblaciones de 10^2 a 10^5 UFC / g (Gaylarde *et al.*, 2001; Hirsch *et al* 1995b; Ortega-Morales *et al.*, 2000; Resende *et al.*, 1992; Urzi, 1993). Sin embargo esto no significa que no son importantes, su actividad puede ser altamente erosiva. Wollenzien *et al.*, (1995), mostraron diferentes géneros de hongos filamentosos (*Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Phoma* y *Ulocladium*) existentes sobre rocas calcáreas en el mediterráneo. Gorbuschina *et al.*, (2002)

detectó principalmente deuteromicetes tales como *Alternaria*, *Cladosporium* y *Trichoderma* sobre monumentos históricos de mármol de San Petersburgo y Moscú. Resende *et al.*, (1996) identificaron un amplio rango de hongos filamentosos sobre rocas esteatita y cuarcita en iglesias del estado de Minas Gerais en Brasil. Los géneros más comunes que encontraron fueron *Cladosporium* y *Penicillium*. Sterflinger (2000) indicó a *Aspergillus niger*, *Penicillium simplissimum* y *Scopulariopsis brevicaulis* como hongos importantes en el ataque de rocas silíceas. Los aislados encontrados de manera general coinciden con otros que han sido reportados en la literatura antes citada y ha sido documentada la participación de los mismos en los diversos procesos de biodeterioro.

8.3 Aislamiento e identificación de hongos levaduriformes

En este estudio se encontraron dos géneros de levaduras; *Aureobasidium* y *Rhodotorula*, los cuales han sido reportados en diversos trabajos desarrollados en monumentos históricos (Gatt, 2007; Gorbuschina *et al.*, 2002, 2003; May, 2003; Urzi *et al.*, 2000). Gorbuschina *et al.*, (2002), mencionan un papel importante de los micromicetes (tipo *Aureobasidium pullulans* y otros) en el proceso de biodeterioro que experimentan edificios y esculturas de mármol en San Petersburgo. Estos mismos autores y otros como Ljaljević y Vulkojević, (2009) han señalado que estos micromicetos provienen de contaminaciones de suelos y plantas, y que una vez establecidos en edificios rocosos, son responsables de los cambios de coloración que dan aspectos antiestéticos y que contribuyen por diversos mecanismos al deterioro de estas estructuras.

8.4 Aislamiento e identificación de bacterias

Kenne, (2007), plantea que es de gran interés notar que el 99 % de las bacterias en el mundo, existen en comunidades microbianas llamadas biopelículas, aunque históricamente los microbiólogos han estudiado la forma libre o plantónica de estas bacterias. En el presente estudio se pudo comprobar la existencia de diferentes géneros como: *Bacillus*, *Kokuria*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Brevundimonas*, *Microbacterium*, *Oceanobacillus*, y *Stenotrophomonas*, a través de su análisis molecular. Gorbuschina *et al.*, (2002), reportaron la existencia de bacterias en monumentos históricos de mármol en San Petersburgo. Las especies aisladas por estos autores entre otras fueron: *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Nitrobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus* y *Azotobacter* entre otros. Las bacterias del género *Nitrobacter*, han sido mencionadas como muy peligrosas para los materiales rocosos del patrimonio cultural, ya que las mismas producen ácidos nitroso y nítrico que resultan corrosivos para las rocas. Un gran número de bacterias ha sido detectado sobre diferentes materiales rocosos y se ha mostrado el predominio de organismos Gram positivos, especialmente bacterias formadoras de esporas como por

ejemplo *Bacillus* sp. (Tayler y May, 1991). Utilizando técnicas que dependen del cultivo de los microorganismos y técnicas independientes al cultivo de los mismos, se ha logrado identificar una variedad de diferentes bacterias que habitan sobre diversos materiales y objetos de arte, como por ejemplo: *Actinobispora*, *Alcaligenes*, *Amycolata*, *Aquaspirillum*, *Arthrobacter*, *Asiosporangium*, *Bacillus*, *Chromohalobacter*, *Cytophagales*, *Erythrobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Paenibacillus*, *Porphyrobacter*, *Promicromonospora*, *Pseudomonas*, *Pseudonocardia*, *Rubrobacter*, *Saccharopolyspora*, *Salmonella*, *Sarcina*, *Sphaerobacter*, *Staphylococcus*, *Streptomonospora*, *Streptomyces*, y *Thermocrismum* (Gurtner *et al.*, 2000; Rölleke, 1996; Rölleke *et al.*, 1996, 1998, 2000; Saiz-Jimenez, 1995, 1997; Portillo *et al.*, 2008; Zanardini *et al.*, 2000). Como antes fue mencionado, muchos de los géneros obtenidos en este trabajo han sido reportados por trabajos previos (antes citados) como existentes sobre diversos monumentos y participando de alguna forma en los procesos de biodeterioro que han sido documentados.

8.5 Identidad molecular de los microorganismos aislados

Existen diferentes métodos para la extracción del ADN a partir de sedimentos y suelos, y ellos varían mayormente en los procedimientos de preparación de la muestra y la eliminación de contaminantes que puedan afectar la calidad del ADN (Ley *et al.*, 2006; Tsai y Olson, 1992; Roose-Amsaleg *et al.*, 2001; Jacobsen y Rasmussen, 1992; Picard *et al.*, 1992).

En el caso de la identificación de los hongos filamentosos las características morfológicas tienen una gran utilidad. Sin embargo, algunas de estas características exhiben una gran plasticidad y por lo tanto algunos parámetros como rangos de tamaño de conidias, edad y estado de madurez de la conidia y los septos pueden traslaparse entre especies. Las características morfológicas pueden también ser influenciadas por el sustrato sobre el cual ha sido crecido el hongo (Denman *et al.*, 2000; Jacobs y Rehner, 1998). Por tanto existe una necesidad de herramientas complementarias que puedan proveer seguridad y reproducibilidad en la identificación de este tipo de especies. Recientemente, se ha incrementado el interés en la aplicación de la tecnología de la PCR para la identificación de diversos microorganismos. Este método y sus aplicaciones ofrece la ventaja de reducir o complementar la necesidad de desarrollar largos y difíciles procedimientos de identificación morfológica (Alves *et al.*, 2005; McDonald y White, 2000).

La región *rep* (Repetitive Extragenic Palindromic) consiste de una secuencia repetida invertida de 33 bp altamente conservadas que está presente en alrededor de 500 copias dispersas alrededor de los cromosomas tanto en *Escherichia coli* como en *Salmonella typhimurium* (Ster *et al.*, 1984; Gilson *et al.*, 1984). Muchas funciones han sido sugeridas para las secuencias *rep* (Hulton *et al.*, 1991) aunque no está del todo claro si cualquiera de

estas pueda ser tomada en cuenta para su conservación y distribución de la secuencia extensiva dentro y entre especies. Se ha sugerido por tanto, que las secuencias *rep* pueden representar una secuencia egoísta la cual es mantenida por conversión del gen (Higgins *et al.*, 1988). Identificar familias de secuencias de ADN repetitivas, ha mostrado ser también una estrategia útil y confiable para determinar las relaciones genéticas dentro de grupos de microorganismos. Aunque las secuencias repetitivas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (*rep*-PCRs) son utilizadas para identificar secuencias nucleotídicas repetidas y altamente conservadas en el ADN bacteriano (Hulton *et al.*, 1991). Gillings y Holley (1997) reportaron que la huella genómica por *rep*-PCR puede también amplificar otras regiones y aun secuencias no bacterianas de los genomas bacterianos. A pesar de estas limitaciones, la huella genómica por *rep*-PCR ha sido utilizada para analizar el ADN de varias especies de hongos (Edel *et al.*, 1995; de Arruda *et al.*, 2003; Reynaldi *et al.*, 2003). Aunque la confiabilidad de huellas genómicas por *rep*-PCR para la caracterización de hongos ha sido validada por otras técnicas (basadas también en huellas genómicas de ADN) tales como amplificación de ADN polimórfico al azar (RAPDs) (Pinazzola *et al.*, 2004) y fragmentos amplificados de longitudes polimórficas (AFLPs) (Frisvad *et al.*, 2005), semejanzas accidentales entre las huellas genómicas de ADN de organismos distantemente relacionados pueden ocurrir cuando se utilizan estas técnicas (Oliveri *et al.*, 2007). La secuencia *eric* (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) está integrada por 126 bp de longitud y no tiene similitud de secuencia con las secuencias *rep*, sin embargo, algunas de las características de las secuencias *eric* y *rep* son similares y ellas pueden ser mantenidas en el genoma bacteriano por mecanismos similares (Hulton *et al.*, 1991). Durante el desarrollo de este trabajo, en tres rondas de amplificación con los iniciadores *eric* se logró amplificar 39 de los 48 aislados de hongos filamentosos y no se logró amplificar a 8 de ellos, entre los que están: T23, T17, III1, II8, III6, I5, I16 y III12. Con *rep* siempre en cada ronda se lograba amplificar mucho menos, lo que nos lleva a sugerir que el grupo de hongos con los cuales estamos trabajando entre los 48 aislados, presentan menos regiones responsivas a este iniciador que para el iniciador *eric*, de hecho habrá que analizar más al detalle aquellas que si respondieron a *eric* a fin de que no se trate de amplificaciones de regiones ajenas al genoma del hongo (Plástidos) y para los análisis de comparación a efectos del análisis general de polimorfismo e identificación de cada hongo se sugiere que se haga tomando en cuenta los resultados obtenidos por las amplificaciones con el iniciador *eric*. Un ejemplo de los resultados obtenidos durante el desarrollo de los *rep*-PCR y *eric*-PCR para hongos filamentosos se muestra en la Figura 18 en la cual se puede ver que de 11 muestras analizadas por ambas técnicas, con *eric* se logra la amplificación de 6 de los aislados y con *rep* solo se logra la amplificación de uno de ellos (T21), trabajando a las condiciones de reacción y para el termociclador según lo descrito en el cuadro número 5. Estas últimas condiciones fueron modificadas para desarrollar las diferentes corridas experimentales. La Figura 19, nos muestran un ejemplo de solo algunos de los amplificados logrados tanto para *eric* como para *rep*. El comportamiento mostrado en los ejemplos dados se mantuvo durante todo el proceso de amplificación para los hongos filamentosos para secuencias repetitivas, ya que en todos los casos se obtuvo mayor número de amplificados con *eric* que con *rep*. Concluido el proceso de amplificación

solo fue posible amplificar 39 aislados con *eric* y 14 aislados con *rep* de 48 aislados totales obtenidos de los alrededores del Castillo de Chapultepec.

La figura 19 nos permiten analizar el comportamiento de los géneros *Fusarium* y *Cladosporium*, confirmándose lo que ya hemos venido discutiendo con anterioridad con respecto a que siempre se observó una mayor y mejor respuesta para los iniciadores *eric* que para los iniciadores *rep* en estos hongos filamentosos. Debido a la calidad de las imágenes alcanzadas no es posible hacer un estudio detallado de la variabilidad que existe entre un grupo en particular (Por ejemplo *Fusarium* en la figura 19). No obstante con la poca información que se puede deducir del patrón de huellas genómicas de esta última figura, podemos ver que existen diferentes patrones de bandeo que nos hacen suponer la existencia de diferencias entre los diferentes aislados de *Fusarium* a nivel de subtipo y en algunos casos parece indicar que se trata de aislados similares aunque para tener una conclusión definitiva habrá que trabajar un poco más con estos aislados a nivel de nucleótidos teniendo en cuenta las limitaciones que estos sistemas genómicos tienen en sí y que han sido argumentadas con anterioridad. La misma figura, con respecto a los aislados de *Cladosporium* (III2, III3 y III5) parece indicar que existen diferencias a nivel de subtipo entre ellas, pero estas diferencias observadas en el patrón de bandeo están sujetas a las mismas limitaciones antes citadas para el grupo *Fusarium*. La Figura 21 nos reafirma lo que antes hemos planteado por medio de la Figura 19 y es que tanto por *eric* como por *rep* es posible ver diferencias entre algunos miembros del grupo de *Fusarium* aislado así como para los aislados III2 y III3 que fue posible amplificar por *rep*-PCR.

Del análisis del patrón de bandeo del gel *eric*-PCR con las condiciones finales de amplificación (Figura 16) se deduce que las cepas 15 (*Rhodotorula glutinis* por API), 16 (*Rhodotorula glutinis* por API) son al parecer el mismo tipo de aislado, mientras que las cepas 18 (*Rhodotorula mucilaginosa* por API), 19 (*Rhodotorula mucilaginosa* por API) muestran patrones de bandeo similares. Sin embargo, estos aislados difieren en el patrón de bandeo del aislado 17 (*Rhodotorula glutinis* por API) el cual tiene un patrón de bandeo que lo muestra como un haplotipo diferente de las *Rhodotorulas* de los aislados 15, 16 y 18,19. Por tanto en general y en correspondencia con el patrón de bandeo, se pueden diferenciar dos grupos de *Rhodotorulas* muy bien diferenciados y restaría por analizar más detenidamente las secuencias nucleotídicas de estos aislados a fin de despejar la duda sobre la posibilidad de un tercer grupo u haplotipo (aislado 17, *Rhodotorula glutinis* por API) dentro de este grupo en los aislados obtenidos del sitio de muestreo. Se hicieron diferentes pruebas variando las condiciones de reacción y la T_m para tratar de lograr amplificar *Aureobasidium pullulans*, pero no fue posible para ninguno de los casos probados para los iniciadores *eric*- y *rep*-PCR.

Junto con factores físicos y químicos, el crecimiento microbiano juega un importante papel en el desarrollo de los procesos de biodeterioro. Todos los microorganismos formadores de biopelículas pueden causar biodeterioro y degradar la roca mecánica, química y estéticamente a través de sus actividades metabólicas y procesos de biomineralización en la biopelícula (Suihko *et al.*, 2007). Grbic *et al.*, (2010) trabajando con muestras

procedentes de dos monumentos de Belgrado, Serbia, encontraron la presencia de géneros de hongos como *Alternaria*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Aspergillus* y *Aureobasidium* entre otros. Estos autores básicamente utilizaron medios de cultivo para el aislamiento y la identificación la hicieron basado en el estudio de características micro y macro morfológicas. Finalmente Grbic *et al.*, (2010) discuten que los géneros *Alternaria*, *Cladosporium* y *Epicoccum* entre otros, son la causa de la descoloración y la exfoliación que se observa en algunos materiales rocosos de los edificios estudiados, produciéndose esto por la penetración mecánica de las hifas y la producción de diferentes pigmentos y ácidos orgánicos. *Aureobasidium pullulans* es señalada como la causante de teñir la superficie de las rocas, disminuyendo las cualidades estéticas de los monumentos.

Redondo *et al.*, (2009) plantean que con el propósito de realizar una clasificación taxonómica más segura y adecuada en el caso de los hongos, se deberá realizar un análisis polifásico que incluya una batería de análisis morfológicos, bioquímicos, fisiológicos y quimiotaxonomicos. Sin embargo, estos mismos autores plantean que esta caracterización no estaría completa sin una aplicación de las más avanzadas técnicas de la biología molecular, que permita identificar familias de secuencias repetitivas de ADN como *rep* y *eric*.

En este trabajo, finalmente se obtuvieron 20 aislamientos de los 48 totales, en los cuales no hay coincidencia con los resultados morfológicos analizados y sus porcentajes de homologías son muy variables (Datos no mostrados), por lo que se considera que con este grupo de aislamientos se deberá continuar trabajando para mejorar la amplificación obtenida con el iniciador 26S y volver a realizar su secuenciación en una etapa posterior a este trabajo. Para este último grupo, generalmente no se logró obtener una secuencia limpia en la mayoría de los casos y sus amplificaciones resultaron bastante difíciles, por estas razones se considera prudente señalar que en futuros trabajos se deberá considerar el método de extracción de ADN que se utilice en dependencia del tipo de microorganismo con el que se esté trabajando. Por ejemplo, utilizar fenol cloroformo para hongos oscuros y levaduras, silica gel para todos los demás aislados. Finalmente se deberá considerar la reacción de secuenciación que se realice ya que esta también determina la calidad de secuencias que se obtengan como respuesta de esta etapa.

El análisis polifásico a las muestras tomadas permitió obtener aislados pertenecientes a géneros como *Mucor* y *Cladosporium*, que se localizaron en los puntos II y III de los muestreados, al igual que *Pestalotiopsis*, *Epicoccum*, *Aspergillus* y *Penicillum*; todos estos géneros de hongos filamentosos han sido mencionados por diversos autores (Grbic *et al.*, 2010) como responsables de procesos de biodeterioros observados por diversos mecanismos involucrados (Gaylarde *et al.*, 2001; Hirsch *et al* 1995b; Ortega-Morales *et al.*, 2000; Resende *et al.*, 1992; Urzi, 1993) por lo que se deberán tener muy en cuenta a la hora de tomar decisiones en cuanto a la protección de estos monumentos.

Fusarium son hongos comunes que provocan infecciones oculares con queratitis como la más común de las infecciones. Las especies más comunes de *Fusarium* que provocan infecciones son *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporium*, mas raramente son mencionadas

otras especies como: *Fusarium dimerum*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium sachari* y *Fusarium polyphialidicum* (Godoy *et al.*, 2004; Vismer *et al.*, 2002; White *et al.*, 1990). Estos últimos autores plantean que *eric*-PCR es una muy buena técnica para distinguir entre aislados estrechamente relacionados que podrían ser indistinguibles por otros métodos.

El análisis directo del polimorfismo en el ADN, es la aproximación más general para establecer la variación genética en los organismos. El análisis de fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP) de ADN nuclear o mitocondrial ha sido utilizada para estimar la diversidad genética de *Fusarium oxysporum* entre especies y entre cepas no patogénicas (Jacobson y Gordon, 1990; Kistler *et al.*, 1991). La región espaciadora interna transcrita (ITS) de los ADNr puede mostrar variación dentro del género y por ello es usada en la diferenciación de especies (Carbone y Kohn, 1993; Chen, 1992).

Diversos trabajos han mostrado la existencia de *Fusarium* en los monumentos (Gatt, 2007; Gorbuschina *et al.*, 2002, 2003; May 2003; Urzi *et al.*, 2000, Grbic *et al.*, 2010), aunque muy poco o nada se ha dicho referente al papel que juegan en los mismos o su relación con los procesos de biodeterioro. En el desarrollo de este trabajo se obtuvieron 10 aislados que fueron identificados como *Fusarium* sp., en la mayoría de los casos y en uno de ellos se logró identificar como *Fusarium solani*. El análisis filogenético, separó el clado correspondiente a *Fusarium* (Figura 20) como un OTU, cuya presentación se desarrolla en la figura 21. Fue posible ver que existen diferencias a nivel de nucleótidos entre los diferentes aislados de *Fusarium*, aunque su especiación no fue posible en este trabajo. Tal y como ha sido reportado por la literatura (Godoy *et al.*, 2004; Vismer *et al.*, 2002; White *et al.*, 1990; Redondo *et al.*, 2009), los análisis de *eric*-PCR y *rep*-PCR, mostraron diferencias en los patrones de bandeo obtenidos, aunque se requiere lograr imágenes con mayor nitidez a fin de poder hacer un mejor análisis de las diferencias existentes entre los mismos.

Las levaduras tradicionalmente han sido clasificadas basándose en sus propiedades morfológicas, fisiológicas y bioquímicas (Barnett *et al.*, 2000). Sin embargo esto es complejo y consumidor de tiempo, pudiendo llevar a una clasificación incorrecta (Deák y Beuchat, 1996). El uso de las técnicas moleculares, tales como los métodos basados en la PCR, han permitido una diferenciación tanto intra específica como la identificación a nivel de especie de aislados de levaduras (De Barros Lopes *et al.*, 1998). Hierro *et al.*, (2004) trabajando con levaduras de la industria vinícola para su identificación y mediante la utilización de iniciadores de secuencias repetitivas de ADN y sus amplificaciones, encontraron que estas secuencias no produjeron patrones de bandeos específicos por cepa, pero si produjeron patrones de bandeo específicos para especies. Estos mismos autores plantean que tanto *rep*-PCR como *eric*-PCR resultan ser de gran utilidad, sencillos y relativamente baratos para la identificación de levaduras. Tanto *Rhodotorulas* como *Aureobasidium* han sido aisladas de monumentos históricos con anterioridad y se ha mencionado la participación de estos hongos levaduriformes en procesos de formación de costras que afectan estéticamente los edificios, pinturas y esculturas pertenecientes al patrimonio cultural (Gatt, 2007; Gorbuschina *et al.*, 2002, 2003; May 2003; Urzi *et al.*, 2000,

Grbic *et al.*, 2010). En estos resultados, se aislaron tanto *Aureobasidium* como *Rhodotorulas*, todas ellas aisladas el punto I de los muestreados, o sea en los muros perimetrales del Castillo. En este caso, *rep*-PCR no fue responsivo en ninguna de las levaduras amplificadas, pero *eric*-PCR si mostró muy buen patrón de bandeado para las *Rhodotorulas* y *Areobasidium* no fue amplificada para ninguna condición trabajando con *eric*-PCR. Los resultados de la figura 16, nos permiten diferenciar la existencia de dos especies definidas de *Rhodotorula*, *glutinis var dairinensis* y *mucilaginoso*, con la posibilidad de una tercer especie en función del análisis del patrón de bandeado (aislado 17 de levaduras, Figura 16).

Gorbuschina *et al.*, (2002), trabajando con monumentos de mármol en San Petersburgo, plantean que la alta abundancia y diversidad de hifas de hongos micromicetos puede ser explicada por las condiciones ambientales favorables que persisten en esa ciudad (alta humedad del aire y temperaturas moderadas en verano) y por la contaminación de los monumentos con materia orgánica y propagulos de hongos que provienen de la vegetación circundante. Por ejemplo muchas especies aisladas de los monumentos: *Aureobasidium pullulans*, *Candida* sp., *Cladosporium cladosporioides*, *Trichoderma viride* entre otros, fueron también encontrados en las plantas cercanas a los monumentos. En los resultados mostrados por este trabajo, se obtuvieron aislados similares a los antes encontrados por Gorbuschina *et al.*, 2002 en monumentos de mármol en la ciudad de San Pertesburgo. La ciudad de México y específicamente el Castillo de Chapultepec, se encuentra rodeado por un área densamente boscosa. Los monumentos existentes en el lugar y el castillo mismo están sometidos a una alta carga orgánica proveniente de la contaminación vehicular de la ciudad (Elliott *et al.*, 2000) y los factores ambientales como humedad y temperatura son muy similares a los descritos por Gorbuschina *et al.*, (2002). Todos esto explica el por qué de la presencia de microorganismos como *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium* y *Trichoderma viride* en los muros perimetrales y en los monumentos hacia el interior del Castillo de Chapultepec. De Leo *et al.*, (1996), mostraron que la micro flora de la vegetación y los suelos de los alrededores a los monumentos, influyen la composición de especies de micromicetos que habitan las estatuas de mármol.

Gorbuschina *et al.*, (2002), trabajando con monumentos de mármol en San Petersburgo, encontraron que tanto en monumentos de mármol como en aquellos monumentos históricos de roca caliza que habían sido investigados, se encontraban bacterias de géneros como: *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Dietzia*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Azotobacter*, *Nitrosospora* y *Nitrobacter*. El número de bacterias nitrificantes que encontraron sobre los monumentos a la princesa Knyaginya Saltykova (1863), al príncipe Knyaz Salagov (1820) y sobre tres monumentos situados en el convento Novodevichy, fue tan baja como de 1 a 100 células por gramo de muestra y en algunos casos encontraron un número tan grande células como 1×10^4 células por gramo de muestra de este tipo de bacterias. Esta cantidad de bacterias producen ácido nítrico y nitroso que son muy perjudiciales a los materiales del patrimonio cultural ya que producen exfoliaciones y daños a pinturas y a superficies del material. En estos mismos monumentos reportaron la existencia de bacterias de tipo

tiónicas que producen ácido sulfúrico, observándose daños apreciables en la estructura de estos monumentos.

Laiz *et al.*, (2009), realizaron aislamientos de *Rubrobacter* de monumentos biodeteriorados en España, realizando el aislamiento con diferentes medios de cultivo y la posterior identificación de los aislados por métodos moleculares. Estos autores mostraron que *Rubrobacter* participa en los procesos de biodeterioro de los monumentos por diferentes mecanismos que incluyen la decoloración y la precipitación de cristales de estruvita que debilitan la estructura del material. Previo a este trabajo, Schabereiter-Gurtner *et al.*, (2001a), demostraron una correlación entre la existencia de bacterias *Rubrobacter* y la decoloración de murales pintados en dos edificios históricos en Austria y Alemania.

En el caso de las bacterias aisladas mediante este estudio, las secuencias obtenidas tanto por el iniciador Com como por el iniciador 16 S (Cuadro 7), nos permitieron identificar que las bacterias aisladas corresponden mayormente a *Bacillus* sp., *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus simplex*, *Arthrobacter* sp., *Ocenaobacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Microbacterium* sp., *Curtobacterium* sp., *Bacillus megaterium*, *Pantoea* sp., *Pantoea agglomerans*, *Kokuria* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Brevundimonas* sp., entre otras con altos porcentajes de homología (98 al 100 %). Estos trabajos están en correspondencia con los resultados mostrados por diferentes autores (Gurtner *et al.*, 2000; Rölleke, 1996; Rölleke *et al.*, 1996, 1998, 2000; Saiz-Jimenez, 1995, 1997; Portillo *et al.*, 2008; Zanardini *et al.*, 2000), quienes han reportado el aislamiento de diferentes géneros bacterianos en monumentos históricos, coincidiendo los trabajos de estos autores con muchos de los géneros que fueron aislados de los alrededores del Castillo de Chapultepec.

Un aspecto importante a destacar es que *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* y *Bacillus pumilus* entre otros se encuentran presentes en las diferentes biopelículas muestreadas en los puntos I, II y III (Figura 8); Sin embargo otros microorganismos como *Bacillus simplex*, *Bacillus psychrodurans*, *Bacillus megaterium*, *microbacterium* y *Oceanobacillus* sp. se encuentran distribuidos fundamentalmente en las biopelículas ubicadas en los puntos II y III (Figuras 8C, 8E y 8F) del sitio de muestreo. Estos últimos aspectos son importantes ya que si se toma en cuenta que la biopelícula observada en el punto I (Figura 8 A) estaba ubicada en la pared del muro perimetral del Castillo de Chapultepec y se formó probablemente por la acción de las escorrentías, los diversos factores ambientales y el efecto del crecimiento de los microorganismos que fueron aislados a partir de ellas. No obstante en el punto II, se observaron dos tipos diferentes de biopelículas, aquellas que fueron similares a las vistas en el punto I (Figura 8 B) y aquellas que se diferenciaron de las demás porque fueron zonas biomineralizadas (Figura 8C). En el punto III (Figura 8 B y C) se observan biopelículas que posiblemente estén contribuyendo al deterioro observado. De aquí que es importante ver que microorganismos están básicamente en las biopelículas de la Figura 8, porque de acá probablemente sea interesante buscar cuales están efectivamente contribuyendo a los procesos de biomineralización y cuáles de estos están efectivamente afectando la estructura del monumento que se observa deteriorado en la Figura 8 D.

8.6 Ensayo de formación de la biopelícula en placa

Se ha asumido que el ambiente de la biopelícula, permite a la célula llevar a cabo sus actividades extracelulares, tales como la degradación enzimática de materia orgánica, comunicación química, coordinación de las actividades de los genes, e intercambio de nutrientes con mayor eficiencia que sus contrapartes que viven en estado libre como células suspendidas en aguas. La biopelícula también es un microambiente donde la precipitación puede ser facilitada o inhibida alrededor de escalas micro espaciales (por ejemplo μm a mm) y exhiben alguna organización espacial. La biopelícula y su matriz EPS (Sustancias poliméricas extracelulares) asociada, por tanto, sirve como un punto de inicio útil para investigar como las moléculas orgánicas influyen los procesos de precipitación (Decho, 2010).

8.6.1 Fase 1: Primer ensayo para la formación de biopelículas

Las comunidades microbianas que se desarrollan asociadas a los sustratos de roca son en parte responsables del deterioro químico y físico de la misma y alteran a través de diferentes mecanismos la apariencia estética y la integridad física del material (Krumbein, 1988) con la consecuente formación de suciedad y transformación de minerales (Eckardt, 1985). La excreción de enzimas y ácidos inorgánicos y orgánicos disuelve los componentes estructurales del sustrato mineral, contribuyendo a los procesos de deterioro (Warscheid *et al.*, 1988).

La formación de la biopelícula sobre una superficie, se ha creído que tiene lugar en al menos dos etapas: Primeramente la adsorción reversible (Marshall *et al.*, 1971) y la adherencia irreversible de los microorganismos a la superficie, seguido de la formación de una matriz estable de la biopelícula sobre la superficie de implante (Charaklis, 1981). La velocidad de este proceso varía ampliamente dependiendo de las condiciones ambientales y del tipo de microorganismo. Sin embargo, las características del medio utilizado, tales como pH, fortaleza iónica y la temperatura, son también consideradas como factores importantes en alterar las propiedades fisicoquímicas de la superficie bacteriana y consecuentemente la adhesión microbiana (Hamadi *et al.*, 2004).

Con el propósito de facilitar el estudio de la adherencia y colonización bacteriana, una variedad de métodos de observación experimental tanto directos como indirectos han sido utilizados. Entre los métodos indirectos están el teñido de la biopelícula bacteriana y los procedimientos de micro titulación en placa (conteo de células teñidas con cristal violeta), entre otros que estiman el número de microorganismos adheridos *in situ* midiendo algunos de los atributos de los microorganismos adheridos (An y Friedman, 2000). Algunos investigadores han encontrado que los métodos estándar de conteo en placa dan un

estimado inapropiado del número de microorganismos en la biopelícula y por tanto no deberían ser usadas en mediciones cuantitativas (Poulsen, 1999). Sin embargo, otros investigadores han encontrado que el raspado de la superficie elimina hasta el 97 % de las células adheridas a láminas de acero inoxidable (Jeon y Frank, 1994), y la agitación remueve hasta el 99 % de las células adheridas a tubos de silicona (Anwar *et al.*, 1992).

Djordjevic *et al.*, (2002), aplicaron el método de micro titulación en placa para determinar la formación de biopelícula por parte de *Listeria monocytogenes*, encontrando que este método detectó la capacidad de formar biopelículas por parte de diferentes cepas de *Listeria*. Además concluye en que este método podría ser de gran ayuda, utilizado en conjunto con la microscopia como un método rápido y reproducible para el desarrollo de ensayos preliminares que permitan seleccionar microorganismos formadores de biopelículas y que a posteriori se podrían aplicar métodos más rigurosos para la cuantificación de la biopelícula formada. A una conclusión similar arribaron Wakimoto *et al.*, (2004). En cuanto al teñido con cristal violeta este fue primeramente descrito por (Christensen *at al.*, 1985) y desde entonces ha sido modificado para incrementar su exactitud y para permitir la cuantificación completa de la biomasa de la biopelícula (Stepanovic *et al.*, 2000). El cristal violeta (CV) es un colorante básico, el cual se liga a moléculas de superficie cargadas negativamente y polisacáridos de la matriz extracelular (Li *et al.*, 2003). Debido a que células tanto vivas como muertas, así como todo aquello ligado a la matriz es teñido por el CV, se ha considerado que este método es pobremente apropiado para evaluar células muertas en la biopelícula (Pitt *et al.*, 2003)

A 48 horas de incubación, las cepas que reportan un mayor crecimiento en microplaca fueron: 27 (*Stenotrophomonas* sp.), 21 (*Pantoea agglomerans*), IIS1 (*Bacillus psychrodurans*), IIS12 (*Bacillus simplex*) y 32 (*Bacillus simplex*). Las cepas que reportan un mayor crecimiento a 48 horas no coinciden en general con las obtenidas en iguales condiciones, pero cuantificadas a las 24 horas, salvo para las cepas 21 (*Pantoea Agglomerans*) y IIS1 (*Bacillus psychrodurans*). Esto puede explicarse según lo que se ha observado en el crecimiento de las cepas que en su mayoría crecen entre las 18 y 24 horas en tubo, salvo algunos casos que requieren más de 24 horas para que se observe un completo crecimiento entre las que están las cepas: 27 (*Stenotrophomonas* sp.), IIS12 (*Bacillus simplex*) y 32 (*Bacillus simplex*). Se lavaron las placas y luego del teñido de las mismas (Figura 27B) en las que se observó crecimiento de biopelícula (Figura 27C) para las cepas: IS16 (*Bacillus subtilis*), IS6 (*Pantoea agglomerans*), IS3 (*Bacillus subtilis*), IS5 (*Bacillus subtilis*), 21 (*Pantoea agglomerans*), IIS15a (*Bacillus cereus*), IIS9b (*Bacillus subtilis*), 31 (*Bacillus simplex*), IIS10 (*Bacillus subtilis*), IIS4 (*Bacillus megaterium*) y IIS5 (*Bacillus simplex*). A este tiempo de incubación de 48 horas se obtienen casi el doble de cepas (11 en total) que son buenas formadoras de biopelículas con respecto a las obtenidas con el tiempo de incubación de 24 horas, lo cual podría estar indicando que la mayoría de nuestras cepas en estudio requieren más de 24 horas en micro placas para iniciar con el proceso de adhesión a la superficie del pozo y formación de biopelículas. Aproximadamente el 84 % de las cepas que forman biopelículas a las 24 horas, aparecen siempre formando biopelículas a las 48 horas (excepto la cepa IS4); esto confirma el

planteamiento que se requieren más de 24 horas para que se formen biopelículas para la mayoría de las cepas en estudio. Finalmente, la lectura de la absorbancia para cuantificar la biopelícula formada, arroja que las 3 mejores cepas formadoras de biopelículas a las 48 horas fueron: IS16 (*Bacillus subtilis*), IIS15a (*Bacillus cereus*) y IIS9b (*Bacillus subtilis*) (Cuadro 9).

A pesar de las limitaciones señaladas al método de micro titulación en placa (Poulsen, 1999) y los inconvenientes planteados para el método utilizando el CV (Pitt *et al.*, 2003), en el desarrollo de este trabajo se pudo separar con relativa facilidad aquellos aislados que mostraron la capacidad de formar biopelículas dentro del grupo inicial de 30 aislados (Figura 28 y 29). Estos resultados y la obtención de aislados con capacidad de formar biopelículas a diferentes tiempos de incubación, están en plena correspondencia con los resultados obtenidos por Djordjevic *et al.*, (2002) y Wakimoto, *et al.*, (2004).

8.6.2 Fase 2: Segundo ensayo para la formación de biopelículas

Diferentes autores, por ejemplo Wakimoto *et al.*, (2004) y Djordjevic *et al.*, (2002) utilizan diferentes concentraciones de glucosa suplementadas al medio de crecimiento según el microorganismo que trabajan, con el propósito de estimular su crecimiento y por ende observar una mejor formación de la biopelícula. Djordjevic *et al.*, (2002) utilizan además trehalosa en dependencia del medio que utilizan y argumentan que la adición de esta azúcar incrementa la producción de la biopelícula, además de que la producción de esta última se ve afectada por la temperatura de incubación y que las mejores condiciones para la formación de la biopelícula se alcanzan cuando se obtiene el medio suplementado con la mejor dosis de azúcar a una temperatura óptima de incubación para el microorganismo.

Los resultados obtenidos muestran una estimulación del crecimiento en micro placa (Crecimiento total) con la adición del suplemento de glucosa, por lo cual se esperaba un efecto positivo en cuanto a la fijación de los microorganismos en la formación de la biopelícula final. Este efecto observado en este experimento, está en correlación con lo que observaron otros autores, entre los que están Wakimoto *et al.*, (2004) y Djordjevic *et al.*, (2002) en lo que respecta a la estimulación del crecimiento total de microorganismos. El análisis de los resultados a 24 y 48 horas nos permite ver que los microorganismos se mantuvieron creciendo todo el tiempo (más allá de las 24 horas), no obstante a que la cepa IIS10 mostró un mayor crecimiento en todo momento, sus resultados en cuanto a formación de biopelículas (medido por su UFC/mL) no difieren significativamente de los resultados de la cepa IS16, aunque si ambas lo hacen de la cepa IIS15a a las 24 horas. A las 48 horas los resultados son muy similares en cuanto orden de magnitud (UFC/mL para la biopelícula) para las tres cepas en estudio, por lo que en general podemos decir que el suplemento de azúcar si estimula el crecimiento, desarrollo y producción de biopelícula a las 24 horas y en general el crecimiento de biomasa para todo el proceso, pero la formación de biopelícula no se ve mayormente afectada con el tiempo para con las cepas IIS10 y

IS16, aunque si beneficia a la cepa IIS15a la cual aumenta en un orden de magnitud a las 48 horas igualando a las cepas anteriores. En comparación a la corrida de la fase 1, los resultados nos muestran que la adición de glucosa favorece grandemente a la cepa IIS10 y que tanto las cepas IIS15a como IIS10 se ven favorecidas en lo que a formación de biopelícula y crecimiento a las 48 horas. Por ende a un mayor tiempo de incubación, estas dos últimas cepas reportan mejores resultados con la adición de glucosa al medio de crecimiento y formación de la biopelícula. La adición de glucosa a las 48 horas, no parece afectar la formación de biopelícula en lo que a la cepa IS16 se refiere y su comportamiento es similar a cuando no se le adiciona nada. Esta última observación para la cepa IS16 realizada según lo datos crudos que se obtuvieron, nos llevó a hacer un análisis más detallado de los resultados normalizados que se presentan en la Figura 29 de este trabajo, destacándose el hecho de que cuando se analizan datos normalizados, el comportamiento antes indicado para el aislado IS16 a las 48 horas, es similar para los aislados IIS15a y IIS10 al mismo tiempo de incubación, lo cual parece sugerir que la adición de azúcares al medio realmente está favoreciendo el crecimiento total de microorganismos, pero este crecimiento no necesariamente se está traduciendo en un incremento significativo del número de microorganismos adheridos en el tiempo o que están formando biopelículas a las 48 horas (Figura 29 C y D).

En el contexto de potenciales aplicaciones, la característica más importante de los sistemas de biopelículas son su versatilidad y adaptabilidad, por ejemplo; estos tienen un amplio espectro de capacidades. Esto hace posible ligar diferentes usos finales con un mismo proceso, por ejemplo; la remoción combinada de nitrato y fosfato con la producción de peces para alimentación humana (Bender y Phillips, 2004; Roeselers *et al.*, 2008). Los microorganismos obtenidos en este trabajo como potenciales formadores de biopelículas y toda la información recabada, sirve de base para el desarrollo futuro de potenciales aplicaciones que podrían cubrir diferentes campos como: bioprecipitación de cristales de carbonato de calcio para la conservación de monumentos históricos, desarrollo de consorcios para potenciales sistemas de biorremediación y tratamiento de residuales, entre otros potenciales usos. De acuerdo con Roeselers *et al.*, (2008), el enfoque del desarrollo de potenciales aplicaciones debería estar basado en el uso de sistemas de cultivos mixtos y abiertos. De aquí que, un claro entendimiento de las comunidades de biopelículas foto tróficas es esencial con el propósito de optimizar su cultivo para una aplicación biotecnológica específica.

8.7 Cinética de crecimiento microbiano

La cinética del crecimiento microbiano describe la relación entre la velocidad específica de crecimiento (μ) de una población microbiana y la concentración de sustrato (S), es una herramienta indispensable en todos los campos de la microbiología (Rova-Kovar y Egli, 1998). Para sobrevivir y competir exitosamente en la naturaleza, muchos de los microorganismos son capaces de asumir muchos de los desafíos ambientales ajustando su

composición celular con respecto a su estructura y funciones metabólicas (Poindexter, 1987). Durante su ciclo de vida muchos microorganismos heterotróficos encuentran hábitats que difieren marcadamente en el espectro y concentración de nutrientes disponibles, además de los parámetros ambientales tales como pH o temperatura (Ková' Rova'-Kovar y Egli. 1998)

El comportamiento de los microorganismos con los cuales se trabajó permitió obtener un conjunto de datos en los que se recoge la absorbancia leída en el tiempo (h), cuadro 10, y en la cual podemos observar que la cepa IIS15a tuvo el mismo comportamiento que se observó durante los experimentos de formación de biopelícula. Esta cepa siempre mostró ser más rápida en su crecimiento y productora de abundante biomasa, de ahí que ella obtenga una alta absorbancia (0.25 al tiempo cero) y que las cepas IS16 y IIS10 tengan un comportamiento más lento en su crecimiento y comparable con el crecimiento observado en los experimentos de biopelícula. De acuerdo con Ková' Rova'-Kovar y Egli (1998), esto nos podría estar indicando una buena adaptación de los microorganismos a las condiciones de trabajo. Los resultados del cuadro 10, podrían indicar que las cepas IS16 y IIS10 son de un rápido crecimiento en el inóculo a nivel de tubo, o sea que a las 20 horas que es cuando son trasladados a erlenmeyer, estos cultivos ya han entrado a fase estacionaria y esto hace que la adaptación en erlenmeyer tome hasta seis horas para dar inicio a la fase exponencial. En cambio la cepa IIS15a, parece ser que a las 20 horas en el inóculo a nivel de tubo aun no ha entrado a fase estacionaria sino que se encuentra en fase exponencial y por ello se adapta rápidamente a las condiciones de erlenmeyer y arranca a crecer rápidamente. Esto podría sugerir que para posteriores etapas de investigación en las cuales se requiera multiplicar masivamente estos microorganismos, las etapas de cultivos a nivel de inóculo para las cepas IS16 y IIS10 podrían estar terminando entre dos a cuatro horas antes que la cepa IIS15a y así pasar con anterioridad a la fase de erlenmeyer. Igual consideración se debería tener en esta fase y sucesivas en correspondencia con lo mostrado en la Figura 32. Nuestros aislados de trabajo provienen de una ambiente rico en materia orgánica (Gorbuschina *et al.*, 2002) y esto probablemente este motivando que su desarrollo sea muy bueno en condiciones de un medio rico (LB) como es el utilizado para su reproducción en este trabajo (Poindexter, 1987). Dado que la cepa IIS15a, mostró una elevada producción de biomasa en comparación con los otros dos aislados en estudio, este deberá ser un parámetro fundamental a considerar en etapas posteriores de investigación, sobre todo si se requieren grandes cantidades de biomasa para el desarrollo de la misma. No obstante se deberá tener sumo cuidado con establecer una adecuada correlación con la información obtenida en cuanto a formación de biopelícula y en cuanto a la formación de cristales de carbonato de calcio (bioprecipitación de carbonatos), la cual es una etapa experimental que se discute a continuación. La obtención de estos resultados cinéticos resulta de gran valor para establecer una correlación (curva de calibración) entre UFC y absorbancia que resulta de gran importancia en el momento en que se desee continuar escalando la producción de estas cepas bacterianas.

Bajo condiciones de crecimiento típicas de un cultivo batch o por lote, donde las fuentes de carbón son suministradas a concentraciones de gramo por litro, se produce una utilización

secuencial de mezclas de fuentes de carbono y esto es considerado una regla más que la excepción. Sorprendentemente, los datos experimentales disponibles claramente han demostrado que en presencia de altas concentraciones de sustrato, la utilización de dos o más fuentes de carbono diferentes, es comúnmente observado tanto para bacterias como para levaduras, independientemente si el crecimiento ocurre bajo condiciones aeróbicas, anaeróbicas, mesofílicas o termofílicas (Egli, 1991; 1995). Los resultados de los cuadros 10 y 11 básicamente fueron obtenidos en condiciones batch o por lote y junto a la Figuras 33 serán de gran utilidad en el momento en que se decida continuar con los trabajos de bioprecipitación de carbonatos de calcio a nivel de las rocas, ya que en ese momento se requerirá un mayor volumen de biomasa que bien podría ser producido a nivel de erlenmeyer (en dicho caso estas curvas serán de utilidad), si los experimentos serán desarrollados en placas de rocas pequeñas o se requeriría producir mayores volúmenes de biomasa a nivel de reactor, o bien si los experimentos se requieren realizar en placas de tamaños grandes o escalas semipiloto. No obstante si se requiere pasar a escala de biorreactor, las curvas dadas servirán solo de referencia para iniciar producciones en dicho biorreactor y se deberán ajustar nuevas curvas de calibración para ese nuevo nivel de producción tal y como se hizo para erlenmeyer y determinar así nuevas condiciones de operación en función de la escala de trabajo. En todo caso se deberá considerar que estos resultados fueron obtenidos en condiciones aeróbicas y mesofílicas, por tanto lo planteado por Egli (1991; 1995), toma mayor valor en el momento de realizar producciones a mayor escala.

8.8 Bioprecipitación de carbonatos de calcio

Se decidió ampliar el espectro de este experimento a las 12 cepas que dieron buenos resultados en biopelículas (tanto a 24 como a 48 horas), a fin de tener información más amplia y no solo con las tres cepas que aportaron mejores resultados en biopelículas; de esta forma, los resultados de bioprecipitación aunados a los resultados de difracción de rayos X y microscopia electrónica de barrido, permiten decidir contando con una gama de resultados que nos digan el tipo y calidad de cristales producidos por cada uno de los aislados. Además de estos resultados se pueden extraer las mejores combinaciones que formen biopelículas y que además formen cristales de carbonatos que puedan ser utilizados en un futuro para el tratamiento y recuperación de las estructuras dañadas en los monumentos.

8.8.1 Prueba de ureasa

Considerando que esta prueba fue incluida en el trabajo a fin de reforzar los experimentos de bioprecipitación, diversos autores han mostrado que la vía metabólica utilizada por la

bacteria tiene influencia en la velocidad de producción de carbonatos y por ende sobre la velocidad de precipitación de carbonatos de calcio (Hammes *et al.*, 2003 a, b; Dick *et al.*, 2006; De Muynck *et al.*, 2008 a y b). Se ha asociado la producción de ureasa con un incremento en la bioprecipitación de cristales de carbonato de calcio (De Muynck *et al.*, 2010) y estos mismos autores han planteado que la producción de carbonatos por medio de la hidrólisis de la urea podría ser fácilmente controlada a la vez que se podrían producir altas concentraciones de carbonato en periodos relativamente cortos de tiempo, haciendo de esta forma que se obtengan grandes aplicaciones biotecnológicas para estos procesos. Considerando lo anterior se sometieron las cepas IS4 (*Bacillus subtilis*), IS16 (*Bacillus subtilis*), IIS15a (*Bacillus cereus*), IIS10 (*Bacillus subtilis*), IIS4 (*Bacillus megaterium*), IIS5 (*Bacillus simplex*), IS6 (*Pantoea agglomerans*), IS3 (*Bacillus subtilis*), IS5 (*Bacillus subtilis*), 21 (*Pantoea agglomerans*), IIS9b (*Bacillus subtilis*) y 31 (*Bacillus simplex*) a la prueba de ureasa, mismas que dieron buenos resultados en cuanto a formar biopelículas.

De la Figura 34 B, es importante destacar que la cepa 21 (*Pantoea agglomerans*) a las 16 horas ya había mostrado un cambio de coloración lo cual nos dice que esta cepa tiene una elevada producción de ureasa en comparación con las restantes cepas. Debido a que aun no se observaba cambio en el control positivo (*Paenibacillus* sp.), se decidió dejar los cultivos en incubación por no menos de cinco días para volver a chequear los resultados. Los resultados a cinco días nos muestran un cambio de coloración en las cepas IIS5 (*Bacillus simplex*), 31 (*Bacillus simplex*), IS5 (*Bacillus subtilis*), IS3 (*Bacillus subtilis*) y IS16 (*Bacillus subtilis*), además de la cepa 21 (*Pantoea agglomerans*) que ya había cambiado a las 16 horas y que a los 5 días muestra una coloración mucho más intensa que las demás, confirmando lo antes dicho de la misma. Debido a que a los 5 días solo se muestra un leve cambio de coloración en el control positivo, se decidió dejar los cultivos en incubación por un tiempo mayor hasta observar un mayor viraje para el positivo.

La Figura 35, nos muestra como todas las cepas que habían resultado ser positivas a la ureasa a los 5 días de prueba, confirman ser positivas a los ocho días produciendo coloraciones tan intensas como la cepa 21 (*Pantoea agglomerans*), lo cual nos dice que las cepas 31 (*Bacillus simplex*), IS5 (*Bacillus subtilis*), IS3 (*Bacillus subtilis*) y IS16 (*Bacillus subtilis*) resultan tan buenas productoras de ureasa como la 21 pero requieren de mayor tiempo para el desarrollo de su metabolismo. La cepa IIS5 (*Bacillus simplex*) aunque positiva a la ureasa al igual que el control positivo, aportó coloraciones inferiores a las cepas antes mencionadas como positivas. Es importante analizar que algunas cepas a los ocho días mostraban un buen crecimiento en el medio [IIS4 (*Bacillus megaterium*) y IIS15a (*Bacillus cereus*)], pero al momento de terminar el experimento (8 días) no mostraban ningún viraje hacia la producción de ureasa. Otras cepas como la IIS9b (*Bacillus subtilis*), IIS10 (*Bacillus subtilis*), IS6 (*Pantoea agglomerans*) y IS4 (*Bacillus subtilis*), simplemente no crecieron en este medio para el análisis de la ureasa. El que estas últimas cepas no hayan crecido a los ocho días en este medio y que cepas como IIS4 (*Bacillus megaterium*) y IIS15a (*Bacillus cereus*) hayan crecido pero no hayan virado hacia la ureasa, nos hace suponer que este medio contiene algunos elementos que no favorecen o que inhiben el crecimiento de algunas bacterias (tipo *Bacillus cereus* y *B. megaterium*), ya

que este medio fue formulado a partir de un medio de fermentación que contenía rojo fenol y se suplementaron la urea, la glucosa y los otros componentes para simular el medio de la ureasa, por tal razón no se deben descartar *a priori* estas cepas sin antes repetir pruebas de ureasa con medios formulados con todos los reactivos tal y como está indicado para la prueba de la ureasa y considerando los resultados obtenidos en las pruebas de bioprecipitación de carbonatos. No obstante los resultados positivos, nos inducen a pensar que se trata de cepas fuertemente productoras de ureasa y se deberá contar firmemente con ellas al considerar los resultados de bioprecipitación de carbonatos, además de que una de ellas la cepa IS16 (*Bacillus subtilis*), tuvo los mejores resultados en cuanto a formación de biopelículas.

8.8.2 Ensayos de bioprecipitación

Jroundi *et al.*, (2010), mostraron que hay abundantes bacterias con actividad carbonatogénica presentes en la roca de los monumentos deteriorados y que son capaces de consolidar eficientemente la roca degradada por medio de la producción de un nuevo cemento de calcita y vaterita si se utiliza una adecuada solución nutricional. Los resultados de este trabajo concuerdan con lo observado por diferentes autores en cuanto a la participación de las bacterias que habitan los monumentos en los procesos de bioprecipitación de carbonato de calcio (Jroundi *et al.*, 2010; Piñar *et al.*, 2010; Jimenez-López *et al.*, 2007 y 2008).

La bioprecipitación de los aislados probados se reportan en las figuras 36 a la 38 y se complementan en el apéndice B figuras 50 a la 52. Estas figuras nos muestran el proceso de formación de cristales de carbonato de calcio por parte de las cepas [IS16 (*Bacillus subtilis*), IIS15a (*Bacillus cereus*) y IIS10 (*Bacillus subtilis*)], mismas que resultaron ser las cepas mejores en el proceso de formación de biopelículas. En la figura 36 se muestra el crecimiento de los cristales durante los primeros 7 días y se puede ver como los mismos van creciendo con el transcurso del tiempo y a los 15 días los cristales han alcanzado su tamaño final, al mismo tiempo se puede ver en ambas figuras los controles en los cuales no había la presencia de microorganismos bacterianos y por tanto solo se puede ver las partículas de carbonato de calcio que en ocasiones pueden hasta llegar a aglutinarse, pero sin llegar nunca a formar verdaderos cristales como los que se muestran ante la presencia de bacterias. Esto último ratifica el hecho de que son las bacterias las que están desarrollando el proceso de formación de cristales. Los resultados obtenidos sugieren que las cepas [IIS4 (*Bacillus megaterium*), IIS5 (*Bacillus simplex*), IIS9b (*Bacillus subtilis*), 21 (*Pantoea agglomerans*) y IS5 (*Bacillus subtilis*)] resultaron ser las mejores en cuanto a bioprecipitación de cristales de carbonato de calcio. En general estas cepas tienen un comportamiento muy similar al mostrado por las cepas [IS16 (*Bacillus subtilis*), IIS15a (*Bacillus cereus*) y IIS10 (*Bacillus subtilis*)] en cuanto al proceso de formación de cristales, comprobándose con ellas que los resultados obtenidos a los 15 días no difieren a simple vista de los obtenidos a los 22 días, lo cual podría traducirse en un ahorro de tiempo al

poder parar el proceso hasta con una semana de anticipación. Cabe destacar que las cepas [IIS4 (*Bacillus megaterium*), IIS5 (*Bacillus simplex*), IIS9b (*Bacillus subtilis*), 21 (*Pantoea agglomerans*) y IS5 (*Bacillus subtilis*)], fueron seleccionadas como las mejores en el proceso de bioprecipitación basado en la abundancia de cristales que se observaba en el microscopio de luz, basado en el tamaño de los mismos y a la cantidad recolectada en la fase de cosecha de dichos cristales. Estos resultados concuerdan muy bien con los reportados por De Muynck *et al.*, (2010); De Muynck *et al.*, (2009); Piñar *et al.*, (2010) y Jroundi *et al.*, (2010), en cuanto a la diversidad de cristales bioprecipitados por diversos aislados, en el predominio de algunos tipos de cristales observados como lo son los romboédricos y la variación del tamaño de los mismos en el tiempo. Por otra parte, tal y como ya sido demostrado por esos autores, son las bacterias las que están provocando esta bioprecipitación de cristales de carbonato de calcio.

Es importante mencionar que el 80 % de las cepas probadas en bioprecipitación pertenecen a las biopelículas II y III de los puntos muestreados y que la mayoría de ellos fueron aislados a partir del punto III que corresponde al monumento en el que se observaron visibles signos de deterioro. Esto último podría ser de gran valor si se considera que uno de los métodos que han sido propuestos para la restauración de los monumentos históricos por diversos investigadores (De Muynck *et al.*,2010; De Muynck *et al.*,2009; De Muynck *et al.*,2008; Piñar *et al.*, 2010; Jroundi *et al.*,2010; Jimenez-Lopez *et al.*, 2007 y 2008), parte de proponer la estimulación de microorganismos presentes o habitantes en el lugar en donde se propone llevar a cabo el trabajo de restauración.

La búsqueda de cepas con características de ser buenas bioprecipitadoras de carbonato de calcio, ha sido una constante en los diversos trabajos citados (Jimenez-Lopez *et al.*, 2007 y 2008), por ello para esta investigación las mejores cepas en cuanto a formación de biopelículas [IS16 (*Bacillus subtilis*), IIS15a (*Bacillus cereus*) y IIS10 (*Bacillus subtilis*)], no coinciden en forma general con aquellas que resultaron ser las mejores en cuanto a bioprecipitación de cristales de carbonato de calcio [IIS4 (*Bacillus megaterium*), IIS5 (*Bacillus simplex*), IIS9b (*Bacillus subtilis*), 21 (*Pantoea agglomerans*) y IS5 (*Bacillus subtilis*)], la cepa 21 (*Pantoea agglomerans*) resultó entre las que si formaron biopelícula y fue la mejor y más rápida en el desarrollo de la prueba de la Ureasa. Al mismo tiempo esta última cepa dio muy buenos resultados en bioprecipitación, por tanto se deberá poner especial interés en ella para el desarrollo de trabajos futuros. Otras cepas como [IIS4 (*Bacillus megaterium*), IIS5 (*Bacillus simplex*), IIS9b (*Bacillus subtilis*) y IS5 (*Bacillus subtilis*)] arrojaron muy buenos resultados en bioprecipitación y también se encontraban entre las 12 que formaron biopelículas del grupo inicial de 30 que se probaron para este experimento (Cuadro 12). Experimentos posteriores deberán considerar no solo la influencia de la producción de ureasa, sino también la dosis de calcio a utilizar, ya que ha sido demostrado que ambos factores influyen notablemente no solo en el proceso de bioprecipitación, sino también en la calidad de los cristales depositados en el tiempo (De Muynck *et al.*, 2010). Diversos estudios han mostrado la efectividad de la bioprecipitación bacteriana en los procesos de bioconservación de los monumentos deteriorados y en la consolidación de la roca caliza (Jroundi *et al.*, 2010; Piñar, *et al.*, 2010). Jroundi *et al.*,

(2010) mostrando que la aplicación *in situ* de los tratamientos que fueron probados en su estudio, resultaron en un significativo reforzamiento de la roca calcarenita deteriorada y que dicha precipitación fue más probablemente debida a la actividad carbonatogénica de las poblaciones de bacterias presentes en la roca. Los resultados de Piñar *et al.*, (2010) revelaron que el medio de cultivo utilizado por ellos en su estudio activó el mismo grupo de bacterias productoras de carbonato de calcio, independientemente del origen de la roca, lo cual los llevó a concluir en que esto podría contribuir a acelerar el proceso de bioprecipitación con una disminución de los costos involucrados.

8.9 Difracción de Rayos X y Microscopia Electrónica de Barrido

En correspondencia con los resultados obtenidos por Jimenez-Lopez *et al.*, (2007) y (2008), los resultados acá mostrados en cuanto a la bioprecipitación de cristales de carbonato de calcio al ser fundamentalmente cristales de calcita, cabe esperar que al ser la calcita más estable que la vaterita (por ejemplo) se obtenga una capa de recubrimiento con un mayor grado de consolidación y durabilidad. Esto quedó demostrado en los trabajos de Jimenez-Lopez *et al.*, (2007) y (2008). Por otra parte, De Muynck *et al.*, (2010) trabajando para determinar la influencia de las dosis de urea y calcio sobre la efectividad de la precipitación de carbonatos bacteriamente inducida, comprueban la importancia de una dosis adecuada tanto de urea como de calcio para estimular el proceso desarrollado por la enzima ureasa a la vez que estos estimulan la precipitación de carbonatos de calcio y nuevamente se comprueba el papel que juegan los cristales de calcita (cristales romboédricos) en la consolidación de la roca caliza en análisis de sonicación y de ganancia de peso por humedad antes y después del tratamiento. Otros autores que han mostrado la efectividad de los tratamientos de biodeposición con calcita son Dick *et al.*, (2006) y Hammes *et al.*, (2003). Le Metayer-Levrel *et al.*, (1999), mostrando aplicaciones de calcita en experimentos desarrollados *in situ* en 1993 en la torre de la iglesia de Saint Médard por parte de la compañía Calcite Bioconcept (Francia) sobre un área de 50 m² y evaluaron los efectos del tratamiento por medio de investigaciones macro y microscópicas, concluyendo que la capa depositada de biocalcita disminuyó la velocidad de absorción de agua hasta en 5 veces, mientras retuvo la permeabilidad a gases sin que se observara influencia alguna sobre los factores estéticos.

Los resultados de la microscopia electrónica de barrido (Figura 39) nos muestran cristales con diferentes morfologías y tamaños, lo cual corrobora lo observado por los análisis con microscopia de luz, confirmándose el papel que juegan las bacterias en el proceso de formación de los cristales (Anne *et al.*, 2010, De Muynck *et al.*, 2008b) al observarse a estos microorganismos insertos en los cristales producidos como puede verse en la Figura 39F, en correspondencia con lo demostrado por De Muynck *et al.*, (2008a y b). De Muynck *et al.*, (2010), quienes plantean que la morfología y el tipo de cristal de carbonato de calcio que sea bioprecipitado, dependen de las condiciones de precipitación tales como la súper saturación inicial, la temperatura y la presencia de impurezas y aditivos. La microscopia

electrónica de barrido a los cristales obtenidos por medio de los aislados que resultaron ser los mejores en cuanto a formar biopelículas y los que resultaron ser los mejores en cuanto a bioprecipitación de cristales, nos muestran cristales de diferentes morfologías, coincidiendo esta observación con lo señalado cuando se analizaron los cristales por microscopia de luz. Diversos estudios han mostrado que la presencia de bacterias afectó la morfología y el tipo de cristal de CaCO_3 precipitado (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2003). Los análisis de difracción de rayos X (Figuras 40 y 41; Cuadro 12) nos indican que los cristales vistos en la microscopia electrónica de barrido y por microscopia de luz, básicamente corresponden a cristales de calcita (CaCO_3) y aragonita (CaCO_3) y en menor proporción a whewellita ($\text{CaCO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Estos resultados muestran el posible potencial que pueden tener los aislados obtenidos para el desarrollo de futuros procesos de bioprecipitación de carbonato de calcio y así proteger el patrimonio cultural edificado, en correspondencia con lo propuesto por Achal *et al.*, (2011) al demostrar que la precipitación de calcita microbiológicamente inducida es un nuevo método con potencial para incrementar la durabilidad de materiales de concreto.

Finalmente, el cuadro 12 resume de manera completa la información obtenida para los 30 aislamientos seleccionados para los experimentos de formación de biopelícula, producción de ureasa, bioprecipitación de cristales de carbonato de calcio, microscopia electrónica de barrido y difracción de rayos X, correlacionando estos resultados con la posición de la biopelícula de la cual fue aislado el microorganismo en particular. Todo esto nos permite para trabajos futuros, el poder seleccionar un microorganismo o varios de ellos con el fin de desarrollar tecnologías para la protección del deterioro observado al patrimonio cultural de superficies asociadas al Castillo de Chapultepec en primer instancia, considerando que ese o esos microorganismos serán autóctonos, con capacidad para formar la biopelícula, bioprecipitar el calcio en forma de recubrimiento aprovechando su capacidad de producir ureasa en dependencia del lugar de donde fueron aislados (Anne *et al.*, 2010; De Muynck *et al.*, 2010; Rodríguez-Navarro *et al.*, 2003).

Lo anterior viene a reafirmar lo que se dijo en el cuerpo del trabajo, de que todo indica que los diferentes microorganismos actúan en diferentes procesos, en diferentes momentos y de manera coordinada para el sostenimiento, vida y acción de la biopelícula en el ambiente. Por tanto, el análisis de los resultados en general y de manera particular a experimentos complementarios para dar cumplimiento a estos objetivos, parecen indicarnos que en la naturaleza estos procesos son mucho más complejos de lo que hasta la fecha los imaginamos con el conocimiento hasta ahora alcanzado y que debemos enfocar nuestra atención a los procesos que se desarrollan en comunidad más que a los que se desarrollan de manera individual. Estos últimos planteamientos en la actualidad están siendo demostrados con la aplicación práctica de procesos que permiten la utilización de diversas comunidades microbianas en el incremento de la durabilidad de los materiales de construcción y que muestran cómo podrían ser aplicados para la protección de las estructuras que constituyen el patrimonio cultural edificado (Wiktor y Jonkers, 2011; Hui *et al.*, 2011; Achal *et al.* 2011).

8.10 Análisis de participación en biodeterioro y/o potencial biotecnológico de los aislados obtenidos

Finalmente, se analizó entre la colección de aislados que microorganismos de los obtenidos podrían tener potencial para el desarrollo de futuros procesos biotecnológicos (cuadros 13 a 16) y donde destaca que varios géneros bacterianos como: *Arthrobacter*, *Kocuria*, *Brevundimonas* y *Pseudomonas* que resultan de gran interés para ser aplicadas a diversos procesos como tratamiento de aguas (Koch *et al.*, 2009), biorremediación de suelos (Kallimanis *et al.*, 2007), biodegradación de contaminantes diversos (Chang *et al.*, 2009; Mariano *et al.*, 2007). Diversas especies de *Bacillus* han sido mencionadas como de gran valor para el desarrollo de procesos de bioprecipitación de cristales de carbonato de calcio y por ende resultan de importancia para el desarrollo de procesos de biorrestauración del patrimonio estructural edificado. En este trabajo se aislaron *Bacillus* como *B. megaterium* (Lian *et al.*, 2006), *B. subtilis* (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2003; Barabesi *et al.*, 2007; Perito *et al.*, 2000; Tiano *et al.*, 1999) y *B. cereus* (Le Metayer-Levrel *et al.*, 1999) que han sido citados como de importancia para estos efectos. *Pseudomonas* también han sido mencionadas para proceso de bioprecipitación de cristales de carbonato de calcio (Zamarreño *et al.*, 2009). En lo que respecta a hongos (cuadro 16), se logró aislar géneros como *Aureobasidium* que resultan de gran valor para el desarrollo de diversos procesos biotecnológicos como la producción de enzimas, sideroforos y exopolisacáridos (Wang *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2008; Sing *et al.*, 2008.). Géneros como *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium* y *Mucor* entre otros, resultan de gran valor para el desarrollo de procesos de producción de enzimas, biodegradación, biorremediación de suelos, producción de compostajes, etc (Giraud *et al.*, 2001; Hansgate *et al.*, 2005; Potin *et al.*, 2004; Yazdi *et al.*, 2006). Por lo que podemos concluir, que entre los más de 60 aislamientos bacterianos y más de 50 fúngicos; existen diferentes microorganismos de los cuales ya han sido documentadas algunas de sus posibles aplicaciones biotecnológicas y quedan muchas opciones por explorar y microorganismos de los cuales se podría buscar posibles aplicaciones futuras.

Los resultados de este trabajo resumidos en los cuadros 13 y 14, nos permiten analizar basados en publicaciones previas el posible papel que estén efectuando algunos de los aislados en el biodeterioro observado en los monumentos y áreas muestreadas del Castillo de Chapultepec, en función del punto muestreado y el tipo de biopelícula observado en cada sitio. Aislados bacterianos como: *Arthrobacter*, *Kocuria*, *Pseudomonas* y diversos tipos de *Bacillus* como *B. cereus*, *B. megaterium* y *B. pumilus* han sido mencionados en diversos trabajos como asociados a monumentos en los cuales se ha observado biodeterioro (Gorbushina *et al.*, 2004; Scheerer *et al.*, 2009; Gaylarde *et al.*, 2001; McNamara *et al.*, 2006; Milanese *et al.*, 2009; Cappitelli *et al.*, 2007; Suihko *et al.*, 2007). Por otra parte y durante el desarrollo de este trabajo, se plantearon y analizaron los diversos efectos observados por los hongos en las estructuras con algún grado de deterioro. Igualmente se ha discutido

sobre los mecanismos por los cuales se está llevando a cabo este biodeterioro por lo que el cuadro 14 resume solo algunos de los géneros aislados por medio de este trabajo y que han sido previamente documentada su participación y mecanismo por el cual participan en el biodeterioro. Géneros como *Aureobasidium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* y *Cladosporium* entre otros que han sido documentados en trabajos previos (Warscheid y Braams 2000; Konkol *et al.*, 2010; Gaylarde *et al.*, 2001; Sterflinger, 2000; Gorbushina *et al.*, 2004; Sterflinger 2000; Sugiyama *et al.*, 2009; Gorbushina *et al.*, 2002). De los resultados de este trabajo se puede concluir que muchos de los aislados obtenidos en los diferentes puntos muestreados ha sido documentada su participación en procesos de biodeterioro, por lo que se deberá prestar especial interés para el desarrollo de trabajos futuros a aquellos aislados de los cuales se conoce el daño que están ejecutando y por sobre todo si los mismos fueron aislados a partir de biopelículas que se encontraban en sitios con daño estructural aparente como el observado en el “Monumento en el patio del Castillo de Chapultepec”.

9. CONCLUSIONES

1. A partir de las muestras tomadas en tres puntos (I, II, III) diferentes asociados al Castillo de Chapultepec, fue posible obtener los siguientes aislados que fueron identificados por vía microbiológica y molecular:

Cuarenta y ocho aislados de hongos filamentosos, con identificación completa para 28 de los mismos hasta el nivel de especie para la mayoría de los casos, destacándose entre estos los géneros *Trichoderma*, *Alternaria*, *Mucor*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Epicoccum* y *Penicillium*, entre otros. Con respecto a levaduras fue posible obtener e identificar 6 aislados de los generos *Aureobasidium pullulans*, *Rhodotorula glutinis* y *Rhodotorula mucilaginosa*. De manera general tanto para hongos filamentosos como para levaduras, fue posible obtener una buena identificación a nivel de especie mediante el análisis filogenético, salvo para el grupo *Fusarium*, del cual solo se obtuvo un aislado a nivel de especie correspondiente a *Fusarium solani* y lo demás se dejó a nivel de género. Adicionalmente, alrededor de 70 aislados bacterianos, fundamentalmente Gram positivos y Gram variables, fueron identificados. Destacándose géneros como *Bacillus*, *Pantoea*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Brevundimonas*, *Microbacterium*, y *Oceanobacilus*, entre otros. El análisis filogenético de las bacterias de estudio permite sugerir que los iniciadores 16S permiten una mejor diferenciación. Cuando se utiliza el iniciador Com la determinación a nivel de especie dentro del género *Bacillus* es incierta, particularmente, cuando se trata de discriminar entre cepas de *Bacillus subtilis* y *B. pumilus*. En general, fue posible obtener gran coincidencia en la identificación bacteriana utilizando ambos iniciadores, exceptuando una cepa (IS6) que fue identificada como *Bacillus simplex* según el iniciador 16S y como *Pantoea agglomerans* según el iniciador Com.

2. Se realizó el perfil de las huellas genéticas por *eric*- y *rep*-PCR para las levaduras y los hongos filamentosos. Para los hongos, en general, se observó una mayor y mejor respuesta para los iniciadores *eric* que para los iniciadores *rep*. A nivel de las levaduras, fue posible diferenciar dos grupos de *Rhodotorulas* y existe la posibilidad de un tercer grupo u haplotipo (aislado 17, *Rhodotorula glutinis* por API) utilizando la técnica de *eric*-PCR. No fue posible amplificar ni por *eric* ni por *rep* a las cepas de *Aureobasidium pullulans* bajo las condiciones probadas. A nivel de los hongos filamentosos, solo se obtuvieron resultados claros para los generos *Cladosporium* y *Fusarium*. Para estos últimos, el análisis de sus huellas genómicas (*rep*- y *eric*-PCR) indico que si existen diferencias entre los diferentes aislados del genero *Fusarium*. Lo anterior fue corroborado a través del análisis del polimorfismo de su secuencia ribosomal.

3. Se observó una relación específica entre la ocurrencia de algunos grupos microbianos y el punto de muestreo. De esta forma, géneros de hongos filamentosos como *Mucor* y *Cladosporium*, se localizaron en los puntos II y III de los muestreados, al igual que *Pestalotiosis*, *Epicoccum*, *Aspergillus* y *Penicillium*; todos estos géneros han sido mencionados por diversos autores como responsables de procesos de biodeterioro en edificios o monumentos históricos. Las levaduras identificadas (*Rhodotorula* y *Aureobasidium*) fueron aisladas únicamente en el punto III. Estos géneros han sido aislados de monumentos históricos con anterioridad y se ha mencionado su participación en procesos de formación de costras que afectan estéticamente los edificios, pinturas y esculturas pertenecientes al patrimonio cultural.

Con respecto a las bacterias aisladas, algunos generos como *B. subtilis*, *B. cereus* y *B. Pumilus* se encuentran presentes en las diferentes biopelículas muestreadas en los puntos I, II y III. Algunas otras especies relacionadas como *B. simplex*, *B. psychrodurans*, *B. megaterium*, *B. microbacterium* y *Oceanobacillus* sp. se encuentran distribuidos fundamentalmente en las biopelículas ubicadas en los puntos II y III. Diversos autores han reportado el aislamiento de estos géneros en monumentos históricos, y se ha relacionado a algunos de estos géneros con la producción de ácidos que contribuyen al biodetrioro.

4. El potencial biotecnológico de las bacterias aisladas se determinó de forma secuencial, primero evaluando su potencial formador de biopelículas, posteriormente su actividad acidificante a través de la prueba de ureasa y finalmente su potencial para la bioprecipitación de cristales de carbonato de calcio. Derivado de estos análisis fue posible concluir que los microorganismos tuvieron diferentes comportamientos de acuerdo a la prueba realizada. Particularmente, el género *Bacillus* fue el que presentó mejor capacidad formadora de biopelícula y bioprecipitante. Aunque otro género *Pantoea agglomerans* también tuvo buenos rendimientos. Algunas cepas como la 21 (*P. agglomerans*) son capaces de crecer tanto en medio líquido en tubos y en micro placas, sin que exista correlación entre el crecimiento en tubo o micro placa con formar biopelículas. Esto podría estar indicándonos el papel diferenciado que juega cada microorganismo en la comunidad denominada biopelícula.

Los aislados mejores formadoras de biopelículas resultaron ser: IS16 (*Bacillus subtilis*), IIS15a (*Bacillus cereus*) y IIS10 (*Bacillus subtilis*). Observándose para estos aislados un 84 % de coincidencia a 24 y 48 horas de incubación y estimulación en el crecimiento y formación de biopelículas por la adición de azúcar al medio. La cepa 21 (*Pantoea agglomerans*), resultó ser la mejor en cuanto a producción de ureasa. Las cinco mejores cepas en cuanto a precipitación de cristales de carbonato de calcio resultaron ser: IIS4 (*Bacillus megaterium*), IS5 (*Bacillus subtilis*), IIS9b (*Bacillus subtilis*), 21 (*Pantoea agglomerans*) y IIS5 (*Bacillus simplex*). A los 15 días de incubación todas las cepas anteriores sin excepción presentan cristales grandes, de diferentes colores y morfologías

diversas sin que estos puedan diferenciarse al menos a simple vista de los cristales obtenidos a los 22 días de incubación

El 80 % de las cepas mejores bioprecipitadoras pertenecen a las biopelículas II y III de los puntos muestreados y la mayoría de ellos fueron aislados a partir del punto III que corresponde al monumento en el que se observaron visibles signos de deterioro sugiriendo para la restauración de los monumentos históricos la estimulación de microorganismos autóctonos.

5. Los análisis de difracción de rayos X, nos indican que los cristales vistos por microscopia electrónica de barrido y por microscopia de luz, corresponden principalmente a cristales de calcita (CaCO_3) y aragonita (CaCO_3) y en menor proporción a whewellita ($\text{CaCO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$).

10 RECOMENDACIONES

1. Diversos géneros de hongos filamentosos como *Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium* y *Epicoccum* han sido mencionados por diversos autores como participantes en procesos de biodeterioro y fueron aislados en el presente trabajo y encontrados en puntos críticos en donde se observó daños al monumento en el patio del Castillo Chapultepec, por lo que se recomienda poner énfasis especial en los mismos. Especial interés habrá de ponerse en futuras investigaciones a los géneros *Fusarium* y *Pestalotiopsis* ya que fueron aislados en los diferentes puntos muestreados sin que se tenga hasta el momento una idea clara de su papel en estas superficies urbanas.
2. Aunque se han sugerido en la literatura, diferentes métodos para la extracción de ADN para hongos filamentosos, especial interés se deberá poner en la extracción del ADN de muestras de hongos oscuros como *Aspergillus niger* y *Stemphylium*, ya que la coloración de los mismos influye en la calidad del ADN obtenido y en su degradabilidad.
3. Debido a que se decidió no realizar el *rep-* y *eric-*PCR para el caso de los aislados bacterianos y considerando los resultados de la identificación por secuenciación, se sugiere realizar estas pruebas a futuro a fin de dilucidar las diferencias intra especies que existen en casos de *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus simplex* entre otros de los grupos aislados.
4. Debido a las diferencias encontradas entre lo observado según morfología y los altos valores de similitud reportados según secuencias del GenBank para el caso de algunos de los aislados de hongos filamentosos, se sugiere la realización de mayores pruebas bioquímicas y microbiológicas a estos grupos de hongos.
5. Mayores trabajos se requieren realizar en pro de dilucidar el papel de la adición de azúcares en la adhesión de los microorganismos durante el proceso de formación de biopelículas, ya que durante este trabajo quedó evidenciado que la adición de azúcares si incrementa la multiplicación de microorganismos totales, pero a las 48 horas parece no ejercer ningún efecto en lo que a adhesión se refiere.
6. A efectos de multiplicar la biomasa para las cepas IS16; IIS15a y IIS10, se recomienda utilizar las curvas de calibración de la cinética reportada en este trabajo y tomar esta información como referencia para la multiplicación a mayor escala a nivel de reactor.
7. Los resultados de la prueba de ureasa, sugieren que trabajos futuros consideren la posible existencia de diversos subtipos bacterianos para una especie determinada, por ejemplo *Bacillus cereus* y *Bacillus megaterium*, y esto podría requerir la realización de un trabajo de biotipificación de algunos grupos de bacterias que no fueron considerados en este trabajo. El hecho de que los aislamientos que resultaron ser los mejores bioprecipitadores de carbonato de calcio hayan sido previamente aislados de los puntos II y III, sugiere la aplicación del método de estimulación de la flora nativa para efectos de remediación y esto es congruente con lo que ha sido recomendado por diferentes autores.

8. Los resultados de bioprecipitación de cristales de carbonato de calcio obtenidos en este trabajo, conducen a recomendar que en un futuro se deberán considerar las dosis de calcio a utilizar (lo cual no era objetivo por ahora) ya que diversos autores han comprobado que esta influye en la calidad y cantidad de cristales que se obtendrán al final del proceso de bioprecipitación.
9. Utilizar el material biológico aislado e identificado mediante este trabajo con el propósito de desarrollar aplicaciones biotecnológicas como las documentadas o en la búsqueda de nuevas aplicaciones, así como en el desarrollo de procesos que permitan la biorremediación del patrimonio estructural edificado.

11 BILIOGRAFIA

- Achal, V., Pana, X y Özyurtb, N. 2011. Improved strength and durability of fly ash- amended concrete by microbial calcite precipitation. *Ecol. Eng.*37: 554-559.
- Adolphe, J.M., Loubiere, J.F., Paradas, J y Soleilhavoup, F. 1990. Procède de traitement biologique d'une surface artificielle. *European patent* 90400G97.0 (after French patent 8903517, 1989).
- Alexander, M. 1994. Biodegradation and bioremediation. *Academic Press, Inc.*, San Diego, USA.
- Alves, A., Phillips, A.J.L., Henriques, I y Correia, A. 2005. Evaluation of amplified ribosomal ADN restriction analysis (ARDRA) as a method for the identification of *Botryosphaeria* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 245: 221-229.
- Amann, R. I., Ludwig, W. y K.H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59:143-169.
- An, Y. H y R. J. Friedman. 2000. Handbook of bacterial adhesion: principles, methods, and applications. *Human Press*, Totowa, N.J
- Anne, S., Rozenbaum, O., Andreazza, P y R.Jean-Luis. 2010. Evidence of a bacterial carbonate coating on plaster samples subjected to the calcite bioconcept biomineralization technique. *Constr. Build. Mater.* 24:1036-1042.
- Anwar, H.,Strap, J. L y Costerton, J. W. 1992. Eradication of biofilm cells of *Staphylococcus aureus* with tobramycin and cephalexin. *Can. J. Microbiol.* 38:618-625.
- Bachmeier, K.L., Williams, A.E., Warmington, J.R y Bang SS. 2002. Urease activity in microbiologically-induced calcite precipitation. *J Biotechnol.* 93:171-81.
- Bang, S.S., Galinat, J.K y Ramakrishnan, V. 2001. Calcite precipitation induced by polyurethane-immobilized *Bacillus pasteurii*. *Enzyme Microb Technol.* 28:404-9.
- Barabesi, C., Galizzi, A., Mastromei, G., Rossi, M., Tamburini, E y Perito, B. 2007. *Bacillus subtilis* gene cluster involved in calcium carbonate biomineralization. *J.Bacteriol.* 189:228-235.
- Barnet, H.L y Hunter. B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. Four Edition. The American Phytopathological Society.
- Barnet, J.A., Payne, R.W y Yarrow D. 2000.YEAST: Characteristics and identification. Third Edition. *Cambridge University Press*.

- Bastian, F., Jurado, V., Nováková, A, Alabouvette, C y Saiz-Jimenez, C. 2010. The microbiology of Lascaux Cave. *Microbiology*. 156: 644-652.
- Bender, J y Phillips, P. 2004. Microbial mats for multiple applications in aquaculture and bioremediation. *Bioresour Technol*.94:229–238
- Berry A E., Chiocchini C., Selby, T., Sosio M y Wellington E M H. 2003. Isolation of high molecular weight ADN from soil for cloning into BAC vectors. *FEMS Microbiol. Lett*. 223:15-20.
- Betancourth, M. B., Botero, J . E y Rivera S. P. 2004. Biopelículas: una comunidad microscópica en desarrollo. *Colombia Médica*. 35: 34-39.
- Betancourth, G.D; Gómez, J. F; Mosquera, J. C y Tirado-Mejía, L. 2010. X-ray diffraction analysis on rocks from emerald mining region. *Scientia et Technica*. 44: 257-260.
- Blackman, I. C y J. F. Frank. 1996. Growth of *Listeria monocytogenes* as a biofilm on various food-processing surfaces. *J. Food Prot*. 59:827–831.
- Borucki, M., Peppin, J.D., White, D., Loge, F y D.R.Call. 2003. Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Appl.Env.Microbiol*. 69:7336-7342.
- Bolton, K. J.,Dodd, C. E. R.,Mead, G. C y M. Waites. 1988. Chlorine resistance of strains of *Staphylococcus aureus* isolates from poultry processing plants. *Lett. Appl. Microbiol*. 6:31–34.
- Brackett, R. E. 1992. Shelf stability and safety of fresh produce as influenced by sanitation and disinfection. *J. Food Prot*.55:808–814.
- Button, D. K. 1993. Nutrient-limited microbial growth kinetics. *Antonie Leeuwenhoek* 63:225–235.
- Cappitelli, F., Principi, P., Pedrazzi, R., Toniolo, L., Sorlini, C., 2007. Bacterial and fungal deterioration of the Milan Cathedral marble treated with protective synthetic resins. *Science of the Total Environment*.385:172–181.
- Carbone, I y Kohn, L.M.1993. Ribosomal DNA sequence divergence within internal transcribed spacer 1 of the Sclerotiniaceae. *Mycologia*.85:415-427.
- Castanier, S., Le Metayer-Levrel, G y Perthuisot, J.-P. 1999. Ca-carbonates precipitation and limestone genesis—the microbiogeologist point of view. *Sediment. Geol*.126: 9–23.
- Chang Y-T., Thirumavalavan M. y Lee J-F. 2010. Effects of PAH biodegradation in the presence of non-ionic surfactants on a bacterial community and its exoenzymatic activity. *J.Environ.Sci.Health, Part A* 45:4-8.
- Characklisw, G. 1981. Fouling biofilm development: a process analysis. *Biotechnol. Bioeng*. 14:1923-1960.

- Chen, W. 1992. Restriction fragment length polymorphisms in enzymatically amplified ribosomal DNAs of the heterothallic *Pythium* species. *Phytopathology*.82:1467-1472.
- Christensen, G.D., Simpson, W.A., Younger, J.J., Baddour, L.M., Barrett, F.F., Melton, D.M y Beachey, E.H., 1985. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J. Clin. Microbiol.*22:996-1006.
- Costerton. J.W., Lewandowski. Z., DeBeer. D., Caldwell. D., Korber .D y James G. 1994. Biofilms the customized microniche. *J Bacteriol.*176:2173-2242.
- Costerton, J.W. 1999. Introduction to biofilms. *Int J Antimicrob Agents.*11:217-221.
- Countway, P.D., Gast, R.J., Savai, P y Caron, D.A. 2005. Protistan diversity estimates based on 18S rADN from seawater incubation in the Western North Atlantic. *J Eukaryot Microbiol.*52:95-106.
- Dea'k, T. y Beuchat, L.R. 1996. Handbook of Food Spoilage Yeasts. Boca Raton, FL: CRC Press.
- de Arruda, M.C.C., Millar, R.N.G., Ferreira, M.A.S.V y Felipe, M.S.S. 2003. Comparison of *Crinipellis pernicioso* isolates from Brazil by ERIC repetitive element sequence-based PCR genomic fingerprinting. *Plant Pathol.*52:236-44.
- De Barros Lopes, M.A., Soden, A., Martens, A.L., Henschke, P.A. y Langridge, P. 1998 Differentiation and species identification of yeasts using PCR. *Int. J Syst Bacteriol.* 48: 279-286.
- Decho, A.W.2010. Overview of biopolymer-induced mineralization: What goes on in biofilms? *Ecol. Eng.*36:137-144.
- Delille, D. 1995. Seasonal changes of subantarctic benthic bacterial communities. *Hydrobiologia.*310:45-57.
- De Leo, F., Criseo, G., y Urzi, C. 1996. Impact of surrounding vegetation and soil on the colonization of marble statues by dematiaceous fungi, *Int. Congr. on Deterioration and Conservation of Stone*, ,pp. 625-630.
- DeLong, E. F., Franks, D. G. y Alldredge, A. L .1993. Phylogenetic diversity of aggregate-attached vs. free-living marine bacterial assemblages. *Limnol. Oceanogr.*38:924-934.
- DeLong, E. F., Wu, K. Y., Pre'zelin, B. B yJovine, R. V. M.1994. High abundance of *Archaea* in Antarctic marine picoplankton. *Nature.*371:695-697.

- De Muynck, W., Verbeken, K., De Belie, N y Verstraete, W. 2010. Influence of urea and calcium dosage on the effectiveness of bacterially induced carbonate precipitation on limestone. *Ecol. Eng.* 36:99-111.
- De Muynck, W., De Belie, N y Verstraete, W. 2009. Microbial carbonate precipitation in construction materials: a review. *Ecol. Eng.*36:118-136.
- De Muynck,W., Cox, K., De Belie, N y Verstraete,W. 2008a. Bacterial carbonate precipitation as an alternative surface treatment for concrete. *Constr. Build. Mater.*22:875–885.
- De Muynck,W., Debrouwer, D., De Belie, N y Verstraete,W. 2008b. Bacterial carbonate precipitation improves the durability of cementitious materials. *Cem. Concr. Res.*38:1005–1014.
- Denman, S .,Crous, P.W.,Taylor, J.E., Kang, J.-C.,Pascoe, I y Wingfield, M.J. 2000., An overview of the taxonomic history of *Botryosphaeria*, and a re-evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rADN phylogeny, *Stud. Mycol.*45:129-140.
- Dick, J., De Windt, W., De Graef, B., Saveyn, H., Van der Meeren, P., De Belie, N y Verstraete, W. 2006. Bio- deposition of a calcium carbonate layer on degraded limestone by *Bacillus* species. *Biodegradation.* 17:357–367.
- Djordjevic, D., Wiedmann, M y McLandsborough. L.A.2002. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monosytogenes* biofilm formation. *Appl.Env.Microbiol.*68:2950-2958.
- Donlan, R.M y Costerton, J.W. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin.Microbiol.Rev.*15:167–193.
- Eckardt, F. E. W. 1985. Solubilization, transport and deposition of mineral cations by microorganisms. Efficient rock weathering agents. En: Drever, J. I. (Ed): *The Chemistry of Weathering*, pp. 161-173.
- Edel ,V., Steinberg ,C., Avelange, I., Laguerre, G y Alabouvette C. 1995. Comparison of 3 molecular methods for the characterization of *Fusarium oxysporum* strains. *Phytopathology.*85:579–85.
- Egli, T. 1991. On multiple-nutrient-limited growth of microorganisms, with special reference to carbon and nitrogen substrates. *Antonie Leeuwenhoek.*60:225–234.
- Egli, T. 1995. The ecological and physiological significance of the growth of heterotrophic microorganisms with mixtures of substrates. *Adv. Microb. Ecol.*14:305-386.
- Elliott, S., Simpson, I:J., Blake, D.R., Bossert, J.E., Chow, J., Colina, J.A., Dubey, M.K., Duce, R.A., Edgerton, S., Gaeney, j., Gupta, M., Guzman, F., Matson, P.A., McNair, L.A., Ortiz, E., Riley, W., Rowland, F.S., Ruiz, M.E., Russell, A.G., Smith, F.A., Sosa, G., Streit, G y

- Watson, J. 2000. Mexico City and the biogeochemistry of global urbanization. *Environ Sci Policy*.3:145-156.
- Escalante A., Rodriguez M E., Martinez A., López-M A., Bolívar F y Gosset G. 2004. Characterization of bacterial diversity in Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rADN analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* 235:273-279.
- Ferris, F.G y Stehmeier, L.G. 1992. Bacteriogenic mineral plugging. *USA Patent* US5143155.
- Floyd, R., Abebe, E., Papert, A y Blaxter, M. 2002. Molecular barcodes for soil nematode identification. *Mol Ecol.* 11:839-850.
- Frank, J. F y Koffi. R. A.1990. Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. *J. Food Prot.* 53:550–554
- Frisvad, J.C., Lund, F y Elmholt, S. 2005. Ochratoxin A producing *Penicillium verrucosum* isolates from cereals reveal large AFLP fingerprinting variability. *J Appl Microbiol.* 98:684–92.
- Gadd, G. M. 2007. Geomycology: Biogeochemical transformations of rocks, minerals and radionucleotides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycol. Res.* 111:3–49.
- García de Miguel, J. M., Sánchez-Castillo, L., Ortega-Calvo, J. J., Gil, J. A. y Saiz-Jimenez, C. 1995. Deterioration of building materials from the Great Jaguar pyramid at Tikal, Guatemala. *Building and Environment* 30: 591-598.
- Gaspar, P.L y De Brito, J. 2008. Quantifying environmental effects on cement-rendered facades: a comparison between degradation indicators. *Building and Environment.* 43:1818-1828.
- Gaylarde, P.M., Gaylarde, C.C., Guiamet, P.S., de Saravia, S.G.G y Videla, H. A. 2001. Biodeterioration of Mayan buildings at Uxmal and Tulum, Mexico, *Biofouling* 17:41–45
- Gillings, M y Holley ,M., 1997. Repetitive element PCR finger-printing (rep-PCR) using enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) primers is not necessarily directed at ERIC elements. *Lett Appl Microbiol.*25:17–21.
- Gilson. E., Clement, J.M., Brutlag, D y Hofnung, M. 1984. A family of dispersed repetitive extragenic paiindromic ADN sequences in *E. coli*. *EMBO J.*3:1417-1421.
- Godoy, P., Cano, J., Gene, J., Guarro, J., Hofling-Lima, A.L y Lopes-Colombo, A. 2004. Genotyping of 44 isolates of *Fusarium solani*, the main agent of fungal keratitis in Brazil. *J. Clin. Microbiol.*42:4494-4497.

- Golubic, S., Friedman, E y Schneider, J. 1981. The lithobiontic ecological niche, with special reference to microorganisms. *J Sediment Petrol.*51:475-478.
- Giraud, F., Giraud, P., Kadri, M., Blake, G y Steiman, R. 2001. Biodegradation of Anthracene and Fluoranthene by fungus Isolated from an Experimental constructed wetland for wastewater treatment. *Wat.Res.* 35:4126-4136.
- Gonzalez, J. M y Moran, M. A. 1997. Numerical dominance of a group of marine bacteria in the α -subclass of the class *Proteobacteria* in coastal seawater. *Appl. Environ. Microbiol.*63:4237-4242.
- Gorbushina, A. A., Lyalikova, N. N., Vlasov, D. Y., y Khizhnyak, T. V. 2002. Microbial communities on the monuments of Moscow and St. Petersburg: Biodiversity and trophic relations. *Microbiology+* 71:350-356. (Translated from *Mikrobiologiya* 71, 409-417).
- Gorbushina, A. A., Whitehead, K., Dornieden, T., Nisse, A., Schulte, A y Hedges, J. L. 2003. Black fungal colonies as units for survival: Hyphal mycosporines synthesized by rock-dwelling microcolonial fungi. *Can. J. Bot.*81:131-138.
- Gorbushina, A., Heyrman, J., Dornieden, T., Gonzalez-Delvalle, M., Krumbein, W.E., Laiz, L., Petersen, K., Saiz-Jimenez, C and Swings J. 2004 Bacterial y fungal diversity and biodeterioration problems in mural painting environments of St. Martins church (Greene-Kreiensen, Germany). *Int. Biodeter. Biodegr.*53:13-24.
- Gorbushina, A. 2007. Life in the rocks. *Environ. Microbiol.*9:1613-1631.
- Gray, J. P y Herwig, R. P. 1996. Phylogenetic analysis of the bacterial communities in marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*62:4049-4059.
- Grady, C. P. L., Jr., B. F. Smets y Barbeau, D. S. 1996. Variability in kinetic parameter estimates: a review of possible causes and proposed terminology. *Water Res.* 30:742-748.
- Grbic, L. W., Vukojevic, J., Simic, G.S., Krizmanic, J y Stupar, W. 2010. Biofilm forming cyanobacteria, algae and fungi on two historic monuments in Belgrade, Serbia. *Arch. Biol. Sci.*62:625-631.
- Griffin, P. S., Indictor, N y Koestler, R. J. 1991. The biodeterioration of stone: a review of deterioration mechanisms, conservation case histories and treatment. *Int.Biodeter* 28:187-207.
- Gurtner, C., Heyrman, J., Piñar, G., Lubitz, W., Swings, J y Rölleke, S. 2000. Comparative analyses of the bacterial diversity on two different biodeteriorated wall paintings by DGGE and 16S rDNA sequence analysis. *Int.Biodeter. Biodegr.*46:229-239.

- Hales, S. G., F. Feijtel, H. King, K. Fox, and Verstraete, W. 1997. Biodegradation kinetics: generation and use of data for regulatory decision making. SETAC-Europe, Brussels, Belgium.
- Hamadi, F., Latrache, H., Elghmari, A., Mabrouki, M., Ellouali, M y Kuider, N. 2004. Effect of pH and ionic strength on hydrophobicity and electron donor and acceptor characteristics of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Ann. Microbiol.*54:213-225.
- Hamilton, W. A. 2003. Microbially influenced corrosion as a model system for the study of metal microbe interactions: a unifying electron transfer hypothesis. *Biofouling*. 19:65-76
- Hammes, F y Verstraete, W. 2002. Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*1:3-7.
- Hammes, F., Boon, N., de Villiers, J., Verstraete, W y Siciliano, S.D. 2003. Strain-specific ureolytic microbial carbonate precipitation. *Appl. Environ. Microbiol.*69:4901-4909.
- Hammes, F., Boon, N., de Villiers, J., Verstraete, W y Siciliano, S.D. 2003a. Strain specific ureolytic microbial calcium carbonate precipitation. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4901-4909.
- Hammes, F., Seka, A., de Knijf, S y Verstraete, W. 2003b. A novel approach to calcium removal from calcium-rich industrial wastewater. *Water Res.*37:699-704.
- Hansgate, A.M., Schloss, P.D., Hay, A.G y Walker, L.P. 2005. Molecular characterization of fungal community dynamics in the initial stages of composting. *FEEM Microbiol Ecol* 51:209-214.
- Hare, M.P., Palumbi, S.R y Butman, C.A. 2000. Single-step species identification of *bivalve* larvae using multiplex polymerase chain reaction, *Mar Biol.*137:953-961.
- Harder, W y Dijkhuizen, L.1976. Mixed substrate utilization. *Continuous Culture.*6:297-314.
- Harder, W y Dijkhuizen, L.1982. Strategies of mixed substrate utilization in microorganisms. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* 297:459-480
- Hayashi, K y Yandell, D.W. 1993. How sensitive is PCR-SSCP? *Hum Mutat.*2:338-346.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L y Waard, J.R. 2003 a. Biological identification through ADN barcodes. *Proc R Soc Lond B.*270:313-321.
- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S y de Waard, J.R. 2003 b. Barcoding animal life: Cytochrome C oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc Biol Sci* 270 (Suppl 1):S96-S99.

- Hebert, P.D.N., Penton, E.H., Burns, J.M., Jansen, D.H y Hallwachs, W. 2004. Ten species in one: ADN barcoding reveals cryptic species in the Neotropical skipper butterfly *Astroptes fulgerator*. *Proc Natl Acad Sci USA*.101:14812-14817.
- Heuer, H., Kroppenstedt, R. M., Lottmann, J., Berg, G y Smalla, K. 2002. Effects of T4 lysozyme release from transgenic potato roots on bacterial rhizosphere communities are negligible relative to natural factors. *Appl. Environ. Microbiol.*68:1325–1335.
- Heyrman, J y Swings, J. 2001. 16S rADN Sequence analysis of bacterial isolates from biodeteriorated mural paintings in the servilia tomb (Necropolis of Carmona, Seville, Spain). *Syst. Appl. Microbiol.*24:417–422.
- Hierro, N., González, A., Mas, A and Guillamón, J.M. 2004. New PCR-based methods for yeast identification. *J Appl Microb.*97:792-901.
- Higgins. C.F., McLaren, R-S y Newbury. S.F. 1988 Repetitive extragenic palindromic sequences, mRNA stability and gene expression: evolution by gene conversion? *A review. Gene.*72:3-14.
- Hirsch, P., Eckhardt, F. E. W y Palmer, R. J., Jr. 1995b. Fungi active in weathering of rock and stone monuments. *Can. J. Bot.* 73, SUP1:S1384–S1390.
- Hořfle, M. G. 1983. Long-term changes in chemostat cultures of *Cytophaga johnsonae*. *Appl. Environ. Microbiol.*46:1045–1053
- Hulton, C.S.J., Higgins, C.F y Sharp, P.M. 1991. ERIC sequences—a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol Microbiol.*5:825–34.
- Hui, R., Xung-Xiang, Q y Rui-Xing, W. 2011. A cementation method of loose particles based on microbe-based cement. *Sci China Tech Sci.* 54:1722-1729.
- Jacobs, K.A y Rehner, S.A. 1998. Comparison of cultural and morphological characters and ITS sequences in anamorphs of Botryosphaeria and related taxa, *Mycologia* 90:601-610.
- Jacobsen, C. S y Rasmussen, O. F. 1992. Development and application of a new method to extract bacterial ADN from soil based on separation of bacteria from soil with cationexchange resin. *Appl. Environ. Microbiol.*58:2458–2462.
- Jacobson, D.J y Gordon, T.R. 1990. Variability of mitochondrial DNA as an indicator of relationships between populations of *Fusarium oxisporum* f. sp.melonis. *Mycol. Res.*94:734-744.
- Jannasch, H. W y Egli. T.1993. Microbial growth kinetics: a historical perspective. *Antonie Leeuwenhoek* .63:213–224.

- Jeong, D. K y Frank. J. F. 1994. Growth of *Listeria monocytogenes* at 10°C in biofilms with microorganisms isolated from meat and dairy processing environments. *J. Food Prot.* 57:576–586.
- Jimenez-Lopez, C., Rodriguez-Navarro, C., Piñar, G., Carrillo-Rosua, F.J., Rodriguez-Gallego, M y Gonzalez-Muñoz, M.T. 2007. Consolidation of degraded ornamental porous limestone stone by calcium carbonate precipitation induced by the microbiota inhabiting the stone. *Chemosphere*.68:1929–1936.
- Jimenez-Lopez, C., Jroundi, F., Pascolini, C., Rodriguez-Navarro, C., Piñar-Larrubia, G., Rodriguez-Gallego, M y Gonzalez-Muñoz, M.T. 2008. Consolidation of quarry calcarenite by calcium carbonate precipitation induced by bacteria activated among the microbiota inhabiting the stone. *Int. Biodeterior. Biodegrad*.62:352–363.
- Jørgensen, B. B y Bak. F.1991. Pathways and microbiology of thiosulfate transformations and sulfate reduction in marine sediment (Kattegat, Denmark). *Appl. Environ. Microbiol*.57:847–856.
- Jroundi, F., Fernandez-Vivas, A., Rodriguez-Navarro, C., Bedmar, EJ y González-Muñoz, M.T.2010. Bioconservation of Deteriorated Monumental Calcarenite Stone and Identification of Bacteria with Carbonatogenic Activity. *Microb.Ecol*.60:39-54.
- Jurado, V., Sanchez-Mora; S and Saiz-Jimenez, C. 2008. Entomogeneous fungi and the conservation on the cultural heritage: A review. *Int. Biodeterior. Biodegrad*.62:325-330.
- Kallimanis A., Frillingos S., Drainas C. y Koukkou A.I. 2007. Taxonomic identification, phenanthrene uptake activity, and membrane lipid alterations of the PAH degrading *Arthrobacter* sp. strain Sphe3. *Appl Microbiol Biot*.76:709-717.
- Kanazawa, H., Nouni, T y Futai, M. 1986. Analysis of *Escherichia coli* mutants of the H⁺-transporting ATPase: determination of altered sites of the structural gene. *Method Enzymol*.126:595–603.
- Kenne, N.2007. Biofilms friends or foe?. *Atlantic clean*.1:3.
- Kistler, H.C., Momol, E.A y Benny, U. 1991. Repetitive genomic sequence for determining relatedness among strains of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*.81:331-336.
- Knorre, H y Krumbein, K.E., 2000. Bacterial calcification. In: Riding, E.E., Awramik, S.M. (Eds.), *Microbial Sediments*. Springer-Verlag, Berlin, pp.25–31.
- Koestler, R. J., Santoro, E. D., Druzik, J., Preusser, F., Koepp, L y Derrick, M. 1988. Ongoing studies of the susceptibility to biodeterioration of stone consolidants to microbiologically induced corrosion. In: Houghton, D. R., Smith, R. N., Eggins, H. O. W., (ed), *Biodeterioration 7*, pp. 441-448. Elsevier Science, London, UK.

- Koch, A. L. 1982. Multistep kinetics: choice of models for the growth of bacteria. *J. Theor. Biol.*98:401-417.
- Konkol, N., McNamara ,C y Mitchell, R. 2010. Fluorometric detection and estimation of fungal biomass on cultural heritage materials. *J.Microbiol Methods*.80:178-182.
- Kova´Rova´, K. 1996. Growth kinetics of *Escherichia coli*: effect of temperature, mixed substrate utilization, and adaptation to carbon-limited growth. *Ph.D. thesis. Swiss Federal Institute of Technology, Zurich*.
- Kova´Rova´-Kovar, K y Egli. T. 1998. Growth kinetics of suspended microbial cells: from single-substrate-controlled growth to mixed-substrate. Kinetics. *Microbiol Mol Biol Rev*.62:3, 646-666.
- Krumbein, W. E. 1988. Microbial interactions with mineral materials. In: Houghton, D., Smith, R., Eggins , H. O. W. (ed.), *Biodeterioration 7*, pp. 78-100. Elsevier, New York, USA.
- Küsel, K., Pinkart, H .C., Drake, H. L y Devereux R. 1999. Acetogenenic and sulfate-reducing bacteria inhabiting the rizoplane and deep cortex of sea grass *Halodule wrightii*. *Appl. Environ. Microbiol*.65:5117-5123.
- Lad, T. L y Costerton, J. W. 1990. Methods for studying biofilm bacteria. *Methods Microbiol*. 22:285-307.
- Laiz, L., Hermosin, B., Caballero, B y Saiz-Jimenez, C. 2001 Facultatively oligotrophic bacteria in Roman mural paintings. In: Protection and Conservation of the Cultural Heritage of the Mediterranean Cities, E. Galan, ed.
- Laiz, L., Miller, A.Z., Jurado, V., Ekatova, E., Sánchez-Moral, S., González, J.M., Dionisio, A., Macedo, M.F y Saiz-Jimenez, C 2009. Isolation of five *Rubrobacter* strains from biodeteriorated monuments. *Naturwissenschaften*.96:71-79.
- Le Metayer-Levrel, G., Castanier, S., Oriol, G., Loubiere, J.F y Perthuisot, J.P.1999. Applications of bacterial carbonatogenesis to the protection and regeneration of limestones in buildings and historic patrimony. *Sediment. Geol*.126:25-34.
- Leff, L., Dana, J., McArthur, J y Shimkets, L. 1995. Comparison of methods of ADN extraction from stream sediments. *Appl. Environ. Microbiol*.61:1141-1143.
- Lewis, F. J., May, E y Bravery, A. F. 1988. Metabolic activity of bacteria isolated from building stone and their relationship to stone decay. En: Houghton, D., Smith, R., Eggins, H. O. W. (ed.), *Biodeterioration 7*, pp. 107-112. Elsevier Science, London ,UK.
- Li, X., Yan, Z y Xu, J., 2003. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiology+*.149:353-362.

- Lian, B., Hu, Q., Chen, J., Ji, J yTeng, H. 2006. Carbonate biomineralization induced by soil bacterium *Bacillus megaterium*. *Geochim Cosmochim Ac.*70:5522–5535.
- Lindsay, D y. von Holy, A 1997. Evaluation of dislodging methods for laboratory-grown bacterial biofilms. *Food Microbiol.*14:383–390.
- Liu, Z., Chi, Z., Wang, L y Li, J. 2008. Production, purification and characterization of an extracellular lipase form *Aureobasidium pullulans* HN2.3 with potential application for the hydrolysis of edible oils. *Biochem Eng J.*40:445-451.
- Louws, F.J., Rademaker, J.L.W y de Bruijn ,F.J. 1999. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: diversity, detection, and disease diagnosis. *Ann Rev Phytopathol.*37:81–125.
- Lovel,l C., Piceno, Y., Quattro, J y Bagwell C. 2000. Molecular Analysis of Diazotroph Diversity in the Rhizosphere of the Smooth Cordgrass, *Spartina alterniflora*. *Appl. Environ. Microbiol.*66:3814-3822.
- Margesin, R y Schinner, F. 1998. Low-temperature bioremediation of a waste water contaminated with anionic surfactants and fuel oil. *Appl Microbiol Biotechnol.*49:482-486
- Mariano, A.P., Bonotto, D.M., de Angelis, D.F., Santos, M.P y Contiero, J. 2007 Comparison of the biodegradability of commercial and weathered diesel oils. 4 PDPETRO, Campinas, SP.6.2.23-1: 1-10.
- Marshall, K.C., Stout, R y Mitchell, R. 1971. Mechanisms of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. *J. Gen. Microbiol.*68:337-348.
- May, E. 2003. Microbes on building stone—For good or ill? *Culture.*24:5–8.
- May, E. 2005. Biobrush research monograph: novel approaches to conserve our European heritage. EVK4-CT-2001-00055.
- Merritt, J.H., Kadouri, D.E y O’Toole. G. A. 2005. Current Protocols in Microbiology Copyright C _ 2005 by John Wiley & Sons, Inc. 1B.1.1-1B.1.17.
- Michaelsen, A. , Piñar, G., Montanari, M y Pinzari, F. 2009. Biodeterioration and restoration of a 16th-century book using a combination of conventional and molecular techniques: A case study. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*63:161–168.
- Milanesi, C. A., Baldi, F., Borin, S., Brusetti, L., Ciampolini, F., Iacopini, F y Cresti, M. 2009. Deterioration of medieval painting in the chapel of the Holy Nail, Siena (Italy) partially treated with Paraloid B72. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*63:844–850
- McCarthy, M. 2001. Breaking up the bacterial happy home. *Lancet.*23:2032-2033.

- McCormack, K., Morton, L.H.G., Benson, J., Osborne, B. N y McCabe R. W. 1996. A preliminary assessment of concrete biodeterioration by microorganisms. *Proceedings LABS 2, Biodeterioration & Biodegradation in Latin America*.68-70. Porto Alegre, Brazil.
- McDonald, J.G.; Wong, E y White. G.P.2000. Differentiation of *Tilletia* species by *rep*-PCR genomic fingerprinting, *Plant Dis*.84:1121-1125.
- McLean, R.J.C., Bates, C.L., Barnes, M.B., McGowin, C.L y Aron, G.M.2004. Methods of studying biofilms. *Microbial Biofilms*. ASM Press.
- McNamara, C. J., Perry, T. D., Bearce, K. A., Hernandez-Duque, G y Mitchell, R. 2006. Epilithic and endolithic bacterial communities in limestone from a Maya archaeological site. *Microbial. Ecol*.51:51–64.
- Monod, J. 1942. Recherches sur la croissance des cultures bactériennes. Hermann et Cie, Paris, France.
- Monod, J. 1949. The growth of bacterial cultures. *Annu. Rev. Microbiol*.3:371–394.
- Monod, J. 1950. La technique de culture continue: theorie and applications. *Ann. Inst. Pasteur*.79:390–410.
- Monte, M. 1991. Multivariate analysis applied to the conservation of monuments: lichens on the Roman aqueduct Anio Vetus in S. Gregorio. *Int Biodeterior*.28:133-150.
- Morton, G. 2003. Things that go rot in the night –a review of biodeterioration. *Microbiology Today*, Aug.30:103-106.
- Moyer, C., F. C. Dobbs y Karl D. M. 1994. Estimation of diversity and community structure through restriction fragment length polymorphism distribution analysis of bacterial 16S rRNA genes from a microbial mat at inactive, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. *Appl. Environ. Microbiol*.60:871–879.
- Muyzer, G., de Waal, E.C y Uitterlinden, A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*.59:695-700
- Narváez-Zapata, J. A., Rodríguez, A. N y Ortega, M.B.O. 2005^a . Method for recovery of intact ADN for community analysis of marine intertidal microbial biofilms. *Molecular Biotechnol*.30:51-55.
- Nemati, M y Voordouw, G. 2003. Modification of porous media permeability, using calcium carbonate produced enzymatically in situ. *Enzyme Microb Technol*.33:635–42.
- Nickel, J. C y Costerton J. W. 1992. Bacterial biofilms and catheters: a key to understanding bacterial strategies in catheter-associated urinary tract infections. *Can. J. Infect. Dis*. 3:619–624

- Nielsen, J y Villadsen, J. 1992. Modelling of microbial kinetics. *Chem. Eng. Sci.*47:4225-4270.
- Oliveri, C., Campisano, A., Catera, C y Cirvilleri, G. 2007. Characterization and AFLP genotyping of *Penicillium* strains from postharvest samples and packinghouse environments. *J Plant Pathol.*89:29-40
- Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K y Sekiya T. 1989.a Detection of polymorphisms of human ADN by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.* 86:2766-2770.
- Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T y Hayashi, K .1989b. Rapid and sensitive detection of point mutations and ADN polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics.* 5:874-879.
- Ortega-Calvo, J. J., Hernández-Marine, H y Saiz-Jiménez, C. 1991. Biodeterioration of buildings materials by cyanobacteria and algae. *Int Biodeterior.* 28:165-186.
- Ortega-Morales, B. O., Hernández-Duque, G., Borges-Gomez, L y Guezennec, J. 1999. Characterization of epilithic microbial communities associated with Mayan stone monuments in Yucatan, Mexico. *Geomicrobiol J.*16:221-232
- Ortega-Morales, B. O., Guezennec, J., Hernández-Duque, G., Gaylarde, C y Gaylarde, P. 2000. Phototrophic biofilms on ancient Mayan buildings in Yucatan, Mexico. *Curr Microbiol.* 40:81-85
- Ortega-Morales B. O., López-Cortés, A., Hernández-Duque, G., Crassous, P y Guezennec, J. 2001. Extracellular polymers of microbial communities colonizing limestone surfaces. *Method Enzymol.* 336:331-339
- O'Toole, G. A y Kolter. R. 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. *Mol. Microbiol.*28:449-461.
- Paerl, H. W. 1982. Factors limiting productivity of freshwater ecosystems. *Adv. Microb. Ecol.* 6:75-110.
- Parrish, D.D.,David, D., Kuster, W.C., Shao, M., Yokouchi, Y., Kondo, y Goldan, P.D., de Gouw, J.A., Koike, M and Shira, T. 2009. Comparison of air pollutant emissions among megacities. *Atmos Environ.*43:6435-6441
- Palumbi, S.R. 1996. Nucleic Acids II: The Polymerase Chain Reaction in; Hillis DM, Mortiz C, Mable BK (eds) *Molecular Systematics*, 2nd edn, Sinauer, Sunderland, pp 205-247.
- Panikov, N. S. 1995. Microbial growth kinetics. Chapman & Hall, London, United Kingdom.

- Parkes, R. J., B. A. Cragg, S. J. Bale, J. M. Getliff, K. Goodman, P. A. Rochelle, J. C. Fry, A. J. Weightman y Harvey, S. M. 1994. Deep bacterial biosphere in Pacific Ocean sediments. *Nature*.371:410–413.
- Peeters, E., Nelis, H.J y Coenye, T.2008. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J. Meth.Microb*.72:157-165.
- Perito, B., Biagiotti, L., Daly, S., Galizzi, A., Tiano, P y Mastromei, G., 2000. Bacterial genes involved in calcite crystal precipitation. In: Ciferri, O., Tiano, P.,Mastromei, G. (Eds.), Of Microbes and Art: The role of microbial communities in the degradation and protection of cultural heritage. Plenum Publisher, New York, pp. 219–230.
- Pianzzola, M.J., Moscatelli, M y Vero, S. 2004. Characterization of *Penicillium* isolates associated with blue mold on apple in Uruguay. *Plant Dis*.88:23–28.
- Picard, C., Ponsonnet, C., Paget, E., Nesme, X y Simonet, P. 1992. Detection and enumeration of bacteria in soil by direct ADN extraction and polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol*.58:2717–2722.
- Piñar, G., Saiz-Jimenez, C., Schabereiter-Gurtner, C., Blanco-Varela, M.T., Lubitz, W y Rölleke, S. 2001 Archaeal communities in two disparate deteriorated ancient wall paintings: detection, identification and temporal monitoring by denaturing gradient gel electrophoresis. *FEMS Microbiol Ecol*.37:45-54
- Piñar, G., Jimenez-Lopez, C., Sterflinger, K., Etenauer, J., Jroundi, F., Fernandez-Vivas, A y Gonzalez-Muñoz.M.T 2010. Bacterial community dynamic during the application of a *Myxococcus xanthus*-inoculated culture medium used for consolidation of ornamental limestone. *Microb. Ecol*.60:15-28.
- Pitts, B., Hamilton, M.A., Zelver, N y Stewart, P.S. 2003. A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. *J. Microbiol. Methods* .54:269–276.
- Poindexter, J. S. 1981. Oligotrophy. Feast and famine existence. *Adv. Microb. Ecol*. 5:63–89.
- Poindexter, J. S. 1987. Bacterial responses to nutrient limitation, p. 283– 317. In M. Fletcher, T. R. G. Gray, and J. G. Jones (ed.), Ecology of microbial communities. *Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom*.
- Poulsen, V. L. 1999. Microbial biofilm in food processing. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol*. 32:321–326.
- Portillo, M. C., Gonzalez, J. M y Saiz-Jimenez, C. 2008. Metabolically active microbial communities of yellow and grey colonizations on the walls of Altamira Cave, Spain. *J. Appl. Microbiol*.104:681-691.

- Potin, O., Rafin, C y Veignie, E., 2004. Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*54:45-52.
- Prieto, B., Silva, B., Rivas, T., Wierzchos, J y Ascaso, C. 1997. Mineralogical transformation and neoformation in granite caused by the lichens *Tephronella atra* and *Ochorelechia parella*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*40:191-199.
- Prez, M., Vieites, J.M y Presa P. 2005. ITS1-rADN-base methodology to identify world-wide hake species of the Genus *Merluccius*. *J Agric Food Chem.*53:5239-5247.
- Raeder ,U y Broda, P. 1985. Rapid preparation of ADN from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology.*1:17-20.
- Ramachandran, S.K., Ramakrishnan, V y Bang. S.S. 2001. Remediation of concrete using micro-organisms. *ACI Mater J.*98:3-9.
- Reid, G., Tieszer, C., Foerch, R., Busscher, H. J., Khoury, A. H y Bruce, A. W. 1993. Adsorption of ciprofloxacin to urinary catheters and effect on subsequent bacterial adhesion and survival. *Cell. Surf. Biointerfaces.*1:9-16.
- Resende, M. A., Leite, C. A., Warscheid, T., Becker, T. W y Krumbein, W. E. 1992. Microbiological investigations on quartzite and soapstone of historical monuments in Minas Gerais, Brazil. In "FIRST LABS, *Proc. First Latin American Biodeter. Symp., Campos do Jordao, Brazil*" (W. C. Latorre and C. C. Gaylarde, Eds.), pp. 17-22. TecArt Editora, Sao Paulo.
- Resende, M. A., Rezende, G. C., Viana, E. V., Becker, T. W y Warscheid, T. 1996. Acid production by fungi isolated from historic monuments in the Brazilian state of Minas Gerais. In "*Biodegradation & Biodeterioration in Latin America, Mircen/UNEP/UNESCO/ICRO-FEPAGRO/UFRGS*" (C. C. Gaylarde, E. L. S. de Sa' and P. M. Gaylarde, Eds.), pp. 65-67. Porto Alegre.
- Reynaldi, F.J., Lopez, A.C, Albo, G.N y Alippi, A.M. 2003. Differentiation of *Ascosphaera apis* isolates by rep-PCR fingerprinting and determination of chalkbrood incidence in Argentinean honey samples. *J Apic Res.*42:68-76.
- Rivadeneira, M.A., Parraga, J., Delgado, R., Ramos-Cormenzana, A y Delgado, G. 2004. Biomineralization of carbonates by *Halobacillus trueperi* in solid and liquid media with different salinities. *FEMS Microbiol. Ecol.*48:39-46.
- Rodriguez-Navarro, C., Rodriguez-Gallego, M., Ben Chekroun, K y Gonzalez-Munoz, M.T. 2003. Conservation of ornamental stone by *Myxococcus Xanthus* induced carbonate biomineralization. *Appl. Environ. Microbiol.*69:2182-2193.
- Roeselers, G., van Loosdrecht, M.C.M y Muyzer G. 2008. Phototrophic biofilms and their potential applications. *J. Appl. Phycol.*20:227-235.

- Rojas-Herrera, R., Narvaez-Zapata, J., Zamudio-Maya, M. y Mena-Martinez, M.E. 2008. A simple silica-based method for metagenomic DNA extraction from soil and sediments. *Mol. Biotechnol.* 40:13-17.
- Rölleke, S. 1996. Molekularbiologischer Nachweis von Eubakterien und Archaea in mittelalterlichen Wandgemälden, Dissertation, University of Vienna.
- Rölleke, S., Muyzer, G., Wawer, C., Wanner, G. y Lubitz, W. 1996. Identification of bacteria in a biodegraded wall painting by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2059-2065.
- Rölleke, S., Witte, A., Wanner, G. y Lubitz, W. 1998. Medieval wall paintings: a habitat for archaea - identification of archaea by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA in a medieval wall painting. *Int. Biodeter. Biodegr.* 41:85-92.
- Rölleke, S., Gurtner, C., Piñar, G. y Lubitz, W. 2000. Molecular approaches for the assessment of microbial deterioration of objects of art. In: Ciferri, O., Tiano, P., Mastromei, G. (Ed). *Of Microbes and Art - The role of Microbial Communities in the Degradation and Protection of Cultural Heritage*. pp. 39- 48. Kluwer Academic/Plenum Publisher New York.
- Roose-Amsaleg, C., Garnier-Sillam, E. y Harry, M. 2001. Extraction and purification of microbial ADN from soil and sediments samples. *Appl Soil Ecol.* 18:47-60.
- Rova'-Kovar, K.K. y Egli, T. 1998. Growth Kinetics of Suspended Microbial Cells: From Single-Substrate-Controlled Growth to Mixed-Substrate Kinetics. *Microbiol Mol Biol* 62:646-666.
- Rutgers, M., M. J. Teixeira de Mattos, P. W. Postma y van Dam, K. 1987. Establishment of the steady-state in glucose-limited chemostat cultures of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Gen. Microbiol.* 133:445-453.
- Rutgers, M., Balk, P. A. y van Dam, K. 1990. Quantification of multiple substrate controlled growth: simultaneous ammonium and glucose limitation in chemostat cultures of *Klebsiella pneumoniae*. *Arch. Microbiol.* 153:478-484.
- Rutgers, M., van Dam, K. y Westerhoff, H. V. 1991. Control and thermodynamics of microbial growth. Rational tools for bioengineering. *Crit. Rev. Biotechnol.* 11:367-395.
- Saiz-Jimenez, C. 1994. Biodeterioration of stone in historic buildings and monuments. In: Leewellyn, C., Dashek, W. V., O'Rear, C. E. (ed.): *Biodeterioration Research 4*, pp. 587-604. Plenum Press, New York.
- Saiz-Jimenez, C. 1995. Deposition of anthropogenic compounds on monuments and their effect on airborne microorganisms. *Aerobiol.* 11:161-75.

- Saiz-Jimenez, C. 1997. Biodeterioration vs. biodegradation: the role of microorganisms in the removal of pollutants deposited on historic buildings. *Int. Biodet. Biodeg.*24:225-232.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F y Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schabereiter-Gurtner, C., Piñar, G., Lubitz, W y Rölleke, S. 2001. An advanced molecular strategy to identify bacterial communities on art objects. *J Microbiol Methods.*45:77-87.
- Schabereiter-Gurtner, C., Piñar, G., Vybiral, D., Lubitz, W y Rölleke, S. 2001a. Rubrobacter-related bacteria associated with rosy discolouration of masonry and lime wall painting. *Arch. Microbiol.*176:347-354.
- Scheerer, S., Ortega-Morales, O y Gaylarde, Ch. 2009. Microbial Deterioration of Stone Monuments- An Updated Overview. *Adv Appl Microbiol.*66:97-139.
- Shirakawa, M.A., Kaminishikawahara, K.K., John, V.M., Kahn, H y Futai, M.M. 2011. Sand bioconsolidation through the precipitation of calcium carbonate by two ureolytic bacteria.65:1730-1733.
- Schmalenberger, A., Schwieger, F y Tebbe, C. 2001. Effect of primers Hybridizing to Different Evolutionarily Conserved Regions of the Small-Subunit rRNA Gene in PCR-Based Microbial Community and Genetic Profiling. *Appl. Environ. Microbiol.*67:3557-3563.
- Schmalenberger, A., Tebbe, C. C., Kertesz, M. A., Drake, H. L y Kusel, K. 2008. Two-dimensional single strand conformation polymorphism (SSCP) of 16S rRNA gene fragments reveals highly dissimilar bacterial communities in an acidic fen. *Eur J soil boi.*44:495 -500.
- Schwieger, F y Tebbe, C. 1998. A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphisms for 16S rRNA gene-bases microbial community analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*64:4870-4876.
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B y Svabic-Vlahovic, M. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol. Methods.*40:175-179.
- Stern, M.J., Ames, G.F L., Smith, N.H., Robinson, E.C y Higgins, C.F. 1984. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. *Cell.*37:1015-1026.
- Sterflinger, K. 2000. Fungi as geologic agents. *Geomicrobiol. J.* 17, 97-124. Stocks-Fischer S, Galinat JK, Bang SS. Microbiological precipitation of CaCO₃. 1999. *Soil Biol Biochem.* 31:1563-1571.

- Sterflinger, K. 2005. Black yeasts and meristematic fungi: Ecology, diversity and identification. In: Rosa, C., Gabor, P. (eds.), *Yeast Handbook: Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Springer, New York, USA, pp.505-518.
- Ström, K., Sjögren, J., Broberg, A y Schnürer, J. 2002. *Lactobacillus plantarum* MiLAB produces the antifungal Cyclic Dipeptides Cyclo (L-Phe-L-Pro) and Cyclo (L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3- Phenyllactic Acid. *Appl. Environ. Microbiol.*68:4322-4327.
- Singh, R.S., Saini, G.K y Kennedy, J.F. 2008. Pullulan: Microbial sources, production and applications. *Carbohydrate Polymers.*73:515-531.
- Sommer, P., Martin-Rouas, C y Mettler. E. 1999. Influence of the adherent population level on biofilm population, structure and resistance to chlorination. *Food Microbiol.* 16:503-515.
- Sugiyama, J., Kiyuna, T., An, K.W., Nagatsuka, Y., Handa, Y., Tazato, N., Hata, J.T., Nishijima, M., Koide, T., Yaguchi, Y., Kigawa, R., Sano, C y Miura, S. 2009. Microbiological survey of the stone chambers of Takamatsuzuka and Kitora tumuli, Nara Prefecture, Japan: a milestone in elucidating the cause of biodeterioration of mural paintings. *Electronic s book*.
- Suihko, L.M.; Alakomi, L.H., Gorbushina, A.A.; Fortune, I.; Marquardt, J y Saarela. M.2007. Characterization of aerobic bacterial and fungal microbiota on surfaces of historic Scottish monuments. *Syst Appl Microbiol.*30:494-508.
- Sunnucks, P.A., Wilson, C.C., Beheregaray, L.B., Zenger, K., French, J y Taylor A.C. 2000. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Mol Ecol.*9:1699-1710
- Taylor, S y May, E. 1991. Detection of specific bacteria on stone using an enzyme-linked immunosorbant assay. *Inter. Biodeterior. Biodegradation.*34:155-167.
- Teske, A., Wawer, C., Muzyer, G y Ramsing. N. B. 1996. Distribution of sulfate-reducing bacteria in a stratified fjord (Mariager Fjord, Denmark) as evaluated by most-probable-number counts and denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified ribosomal ADN fragments. *Appl. Environ. Microbiol.*62:1405-1415.
- Tiano, P., Biagiotti, L y Mastromei, G. 1999. Bacterial bio-mediated calcite precipitation for monumental stones conservation: methods of evaluation. *J. Microbiol. Methods.* 36:139-145.
- Tiano, P., Cantisani, E., Sutherland, I Paget, J.M., 2006. Biomediated reinforcement of weathered calcareous stones. *J. Cult. Herit.*7:49-55.
- Torsvik, V., Sørheim, R y Goksøyr, J.1996. Total bacterial diversity in soil and sediment communities—a review. *J. Ind. Microbiol.*17:170-178.

- Tsai, Y y Olson, B. 1992. Rapid method for separation of bacterial ADN from humic substances in sediments for polymerase chain reaction *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2292-2295.
- Urzi, C. 1993. Interactions of some microbial communities in the biodeterioration of marble and limestone. In "*Trends in microbiology*" (R. Guerrero and C. Pedros-Alio, Eds.), pp. 667-672. *Spanish Society for Microbiology*.
- Urzi, C., de Leo, F., de How, S y Sterflinger, K. 2000. Recent advances in the molecular biology and ecophysiology of meristematic stone-inhabiting fungi. In "Of microbes and art. The role of microbial communities in the degradation and protection of cultural heritage" (O. Ciferri, P. Tiano and G. Mastromei, Eds.), pp. 3-21. Kluwer Academic/ Plenum Publisher, New York.
- Videla, H. A. 1996. Manual of Biocorrosion. Lewis Publishers/CRC Press. Boca Raton, FL, USA. 288 pp.
- Videla, H. A. 1998. Biodeterioration of the Ibero American cultural heritage. A problem to be solved. *Proceedings LATINCORR/98*. Paper No. S11-02, 5 pp. Cancún, México.
- Videla, H. A., Guimet, P. S y Gómez de S. 2003. Biodeterioro de materiales estructurales de sitios arqueológicos de la civilización maya. *Revista del Museo de La Plata Publicación Técnica y Didáctica*.44:1-11.
- Vismer, H. F., Marasas, W. F. O., Rheeder, J. P y Joubert. J. J. 2002. *Fusarium dimerum* as a cause of human eye infection. *Med. Mycol.*40:399-406.
- Vroom. J.M., De Grauw. K.J y Gerritsen. H.C. 1999. Depth penetration and detection of pH gradients in biofilms by two photon excitation microscopy. *Appl Environ Microbiol.*65:3502-3511
- Wakimoto, N., Nishi, J., Sheikh, J., Nataro, J.P., Sarantuya, J., Iwashita, M., Manago, K., Tokuda, K., Yoshinaga, M y Kawano. Y. 2004. Quantitative biofilm assay using a microtiter plate to screen for enteroaggregative *Escherichia coli*. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*71:687-690.
- Walker, J y Rapley, R. 2000. Molecular Biology and Biotechnology. 4a. ed. Royal Society of Chemistry, RU.
- Wang, W.L., Chi, Z.M., Chi, Z., Li, J y Wang, X.H. 2009. Siderophore production by the marine derived *Aureobasidium pullulans* and its antimicrobial activity. *Bioresource Technol.* 100:2639-2641.
- Warscheid, T., Petersen, K y Krumbein, W. 1988. Effect of cleaning on the distribution of microorganisms on rock surfaces. En: Houghton, D., Smith, R., Eggins, H. O. W. (eds). *Biodeterioration* 7, pp. 455-460. Elsevier, New York, USA.

- Warscheid, T., Oetling, M y Kumbrein, W. E. 1991. Physico-chemical aspects of biodeterioration processes on rocks with special regard to organic pollutants. *Int. Biodeterior.*28:37-48.
- Warscheid, T y Braams, J. 2000. Biodeterioration of stone: *A review. Int. Biodeterior. Biodeg.* 46:343-368.
- Warren, L.A., Maurice, P.A y Ferris, F.G. 2001. Microbially mediated calcium carbonate precipitation: implications for interpreting calcite precipitation and for solid-phase capture of inorganic contaminants. *Geomicrobiol. J.*18:93-115
- Wasserbauer, R., Zadak, Z y Novotny, J. 1988. Nitrifying bacteria on the asbestos-cement roofs of stable buildings. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*24:153-165.
- Wiktor, V y Jonkers, H. 2011. Quantification of crack-healing in novel bacteria-based self-healing concrete. *Cement Concrete Comp.*33:763-770.
- White T. J., Bruns T., Lee S y Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes form phylogenetics. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, T. J. White (Eds.), *Academic Press, London UK.* pp. 315-322.
- Wollenzien, U., De Hoog, G. S., Krumbein, W. E y Urzi, C. 1995. On the isolation of colonial fungi occurring on and in marble and other calcareous rocks. *Sci. Total Environ.*167:287-294.
- Wong, F.Y., Carson, J y Elliot, N.G. 2004. 18S ribosomal ADN-based PCR identification of *Neoparamoeba pemaquidensis*, the agent of amoebic gill disease in sea-farmed salmonids. *Dis Aquat Organ.*60:65-76
- Yazdi, M.T., Zarrini, G., Mohit, E., Faramarzi, M.A., Setayesh, N., Sedighi, N y Mohseni, F.A. 2006. *Mucor hiemalis*: a new source for uricase production. *World J Microbial Biotech.* 22:325-330.
- Zamarreño, D.V., Inkpen, R y May, E. 2009. Carbonate Crystals Precipitated by Freshwater Bacteria and Their Use as a Limestone Consolidant. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:5981-5990.
- Zanardini, E., Abbruscato, P., Ghedini, N., Realini, M y Sorlini, C. 2000. Influence of atmospheric pollutants on the biodeterioration of stone. *Int. Biodet. Biodeg.*45:35-42.
- Zegarra, M.G y Montesinos. S. 2010. Aplicaciones de Microscopia electrónica de barrido (SEM) y análisis de fractura de una aleación de Cu-10Al. Facultad de Ciencias Físicas y matemáticas, Universidad de Chile. Guia de estudio.

12 APÉNDICES

12.1. Apéndice A. Secuencias procesadas para los aislados obtenidos en las diferentes biopelículas muestreadas.

Cuadro 17. Secuencias obtenidas para cada uno de los aislados con su código interno para el laboratorio, el nombre con el que finalmente se identificó y su correspondiente accesión al GenBank

Código Gen Bank(Código Interno)	Aislado Identificado como	Accesión al GenBank
Hongos filamentosos identificados con iniciador 26S		
CBG_II6CCH (II6)	<i>Mucor hiemalis f. hiemalis</i>	HQ018877
CBG_III12CCH (III12)	<i>Mucor hiemalis f. hiemalis</i>	HQ018878
CBG_III9CCH (III9)	<i>Leptosphaerulina australis</i>	HQ018879
CBG_III13CCH (III13)	<i>Mucor hiemalis f. hiemalis</i>	HQ026777
CBG_I11CCH (I11)	<i>Phomas sp</i>	HQ026778
CBG_T21CCH (T21)	<i>Trichoderma harzianum</i>	HQ026779
CBG_II2CCH (II2)	<i>Trichoderma viride</i>	HQ026780
CBG_II8CCH (II8)	<i>Trichoderma atroviride</i>	HQ026781
CBG_III16CCH (III16)	<i>Pestalotiopsis sp.</i>	HQ026782
CBG_II1CCH (II1)	<i>Fusarium sp.</i>	HQ026783
CBG_I2CCH (I2)	<i>Fusarium sp.</i>	HQ026784
CBG_T11CCH (T11)	<i>Fusarium sp.</i>	HQ026807
CBG_II4CCH (II4)	<i>Fusarium sp.</i>	HQ026785
CBG_I9CCH (I9)	<i>Fusarium sp.</i>	HQ026786
CBG_III1CCH (III1)	<i>Fusarium sp.</i>	HQ026787
CBG_T12CCH (T12)	<i>Fusarium sp.</i>	HQ026788
CBG_I7CCH (I7)	<i>Fusarium sp.</i>	HQ026789
CBG_I13CCH (I13)	<i>Fusarium sp.</i>	HQ026790
CBG_I10CCH (I10)	<i>Fusarium sp.</i>	HQ026791
CBG_T23CCH (T23)	<i>Fusarium solani</i>	HQ026792
CBG_III2CCH (III2)	<i>Cladosporium sp.</i>	HQ026793
CBG_III3CCH (III3)	<i>Cladosporium sp.</i>	HQ026794
CBG_III5CCH (III5)	<i>Cladosporium sp.</i>	HQ026795
CBG_III11CCH (III11)	<i>Aspergillus fumigatus</i>	HQ026796
CBG_T22CCH (T22)	<i>Aspergillus niger</i>	HQ026797
CBG_I1CCH (I1)	<i>Alternaria sp.</i>	HQ026798
CBG_III10CCH (III10)	<i>Alternaria tenuissima</i>	HQ026799
CBG_III6CCH (III6)	<i>Penicillium sp.</i>	HQ026806
Hongos levaduriformes identificadas con iniciador 26S		
CBG_11CCH (11)	<i>Aureobasidium pullulans</i>	HQ026800
CBG_15CCH (15)	<i>Rhodotorula dairenensis</i>	HQ026801

CBG_16CCH (16)	<i>Rhodotorula dairenensis</i>	HQ026802
CBG_17CCH (17)	<i>Rhodotorula</i> sp.	HQ026803
CBG_18CCH (18)	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	HQ026804
CBG_19CCH (19)	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	HQ026805

Bacterias identificadas por iniciador 16S.

CCH_CBGLBI1S (IS7)	<i>Kocuria</i> sp.	JF899593
CCH_CBGLBI2S (IS8)	<i>Bacillus pumilus</i>	JF899594
CCH_CBGLBI17S (IIS10)	<i>Bacillus pumilus</i>	JF909566
CCH_CBGLBI26S (IIS7)	<i>Bacillus pumilus</i>	JF909571
CCH_CBGLBI27S (IIS9)	<i>Bacillus pumilus</i>	JF909572
CCH_CBGLBI29S (IIS2)	<i>Bacillus pumilus</i>	JF909574
CCH_CBGLBI7S (IIS17)	<i>Bacillus cereus</i>	JF909560
CCH_CBGLBI12S (IIS9a)	<i>Bacillus cereus</i>	JF909561
CCH_CBGLBI14S (IIS15a)	<i>Bacillus cereus</i>	JF909563
CCH_CBGLBI21S (IIS11)	<i>Bacillus cereus</i>	JF909568
CCH_CBGLBI33S (IS12)	<i>Bacillus cereus</i>	JF909577
CCH_CBGLBI4S (IIS2)	<i>Bacillus subtilis</i>	JF909558
CCH_CBGLBI16S (IS16)	<i>Bacillus subtilis</i>	JF909565
CCH_CBGLBI28S (IS3)	<i>Bacillus subtilis</i>	JF909573
CCH_CBGLBI32S (IIS10)	<i>Bacillus subtilis</i>	JF909576
CCH_CBGLBI35S (IIS9b)	<i>Bacillus subtilis</i>	JF909579
CCH_CBGLBI6S (IS6)	<i>Bacillus simplex</i>	JF909559
CCH_CBGLBI13IIS (IIS5)	<i>Bacillus simplex</i>	JF909562
CCH_CBGLBI20S (IIS3)	<i>Bacillus simplex</i>	JF909567
CCH_CBGLBI24S (IIS12)	<i>Bacillus simplex</i>	JF909570
CCH_CBGLBIPS (31)	<i>Bacillus simplex</i>	JF909580
CCH_CBGLBIQS (32)	<i>Bacillus simplex</i>	JF909581
CCH_CBGLBI3S (IS4)	<i>Bacillus</i> sp.	JF899595
CCH_CBGLBI15S (IS5)	<i>Bacillus</i> sp.	JF909564
CCH_CBGLBI23S (IIS5)	<i>Bacillus</i> sp.	JF909569
CCH_CBGLBI30S (IIS4)	<i>Bacillus megaterium</i>	JF909575
CCH_CBGLBI34S (IIS1)	<i>Bacillus psychrodurans</i>	JF909578
CCH_CBGLBI11S (IS1)	<i>Pseudomonas</i> sp.	JF909582
CCH_CBGLBI19S (IS17a)	<i>Pseudomonas</i> sp.	JF909583
CCH_CBGLBI22S (IS10)	<i>Pseudomonas</i> sp.	JF909584
CCH_CBGLBI36S (IIS19a)	<i>Brevundimonas</i> sp.	JF909586
CCH_CBGLBI38S (IS2)	<i>Arthrobacter</i> sp.	JF909587
CCH_CBGLBI40S (IIS9)	<i>Arthrobacter</i> sp.	JF909588
CCH_CBGLBI39S (IIS16a)	<i>Microbacterium</i> sp.	JF909589
CCH_CBGLBI42S (IIS16)	<i>Microbacterium</i> sp.	JF909590
CCH_CBGLBI44S (IIS6)	<i>Oceanobacillus</i> sp.	JF909591
CCH_CBGLBIBS (27)	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	JF909592
CCH_CBGLBIJS (33)	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	JF909593
CCH_CBGLBIRS (21)	<i>Pantoea agglomerans</i>	JF909594
CCH_CBGLBI25S (IIS4)	<i>Pantoea agglomerans</i>	JF909585

Bacterias identificadas por iniciador Com.

CCH_CBGLBI1C (IS7)	<i>Kocuria</i> sp.	JN107760
CCH_CBGLBI2C (IS8)	<i>Bacillus pumilus</i>	JN107761

CCH_CBGLBI9C (IS15)	<i>Bacillus pumilus</i>	JN107764
CCH_CBGLBI17C (IIS10)	<i>Bacillus pumilus</i>	JN107771
CCH_CBGLBI27C (IIS9)	<i>Bacillus pumilus</i>	JN107776
CCH_CBGLBI29C (IIS2)	<i>Bacillus pumilus</i>	JN107778
CCH_CBGLBIFC (13)	<i>Bacillus pumilus</i>	JN107786
CCH_CBGLBI12CI (IIS9a)	<i>Bacillus cereus</i>	JN107766
CCH_CBGLBI14C (IIS15a)	<i>Bacillus cereus</i>	JN107768
CCH_CBGLBI7C (IIS17)	<i>Bacillus cereus</i>	JN107763
CCH_CBGLBI18C (IS9)	<i>Bacillus cereus</i>	JN107772
CCH_CBGLBI33C (IS12)	<i>Bacillus cereus</i>	JN107781
CCH_CBGLBIEC (25)	<i>Bacillus cereus</i>	JN107785
CCH_CBGLBI15C (IS5)	<i>Bacillus subtilis</i>	JN107769
CCH_CBGLBI16C (IS16)	<i>Bacillus subtilis</i>	JN107770
CCH_CBGLBI3C (IS4)	<i>Bacillus subtilis</i>	JN107762
CCH_CBGLBI10C (IIS15r)	<i>Bacillus subtilis</i>	JN107765
CCH_CBGLBI28C (IS3)	<i>Bacillus subtilis</i>	JN107777
CCH_CBGLBI32C (IIS10)	<i>Bacillus subtilis</i>	JN107780
CCH_CBGLBI35C (IIS9b)	<i>Bacillus subtilis</i>	JN107783
CCH_CBGLBICC (36)	<i>Bacillus subtilis</i>	JN107784
CCH_CBGLBI13C (IIS5)	<i>Bacillus</i> sp.	JN107767
CCH_CBGLBI20C (IIS3)	<i>Bacillus</i> sp.	JN107773
CCH_CBGLBI24C (IIS12)	<i>Bacillus</i> sp.	JN107774
CCH_CBGLBIBC (27)	<i>Bacillus</i> sp.	JN107775
CCH_CBGLBIPC (31)	<i>Bacillus</i> sp.	JN107787
CCH_CBGLBIQC (32)	<i>Bacillus</i> sp.	JN107788
CCH_CBGLBI30C (IIS4)	<i>Bacillus megaterium</i>	JN107779
CCH_CBGLBI34C (IIS1)	<i>Bacillus psychrodurans</i>	JN107782
CCH_CBGLBI11C (IS1)	<i>Pseudomonas</i> sp.	JN107792
CCH_CBGLBI19C (IS17a)	<i>Pseudomonas</i> sp.	JN107793
CCH_CBGLBI41C (IS17)	<i>Pseudomonas</i> sp.	JN107794
CCH_CBGLBI37C (IIS8)	<i>Curtobacterium</i> sp.	JN107795
CCH_CBGLBI38C (IS2)	<i>Arthrobacter</i> sp.	JN107796
CCH_CBGLBI40C (IIS9)	<i>Arthrobacter</i> sp.	JN107797
CCH_CBGLBI45C (IIS3)	<i>Arthrobacter</i> sp.	JN107798
CCH_CBGLBI44C (IIS6)	<i>Oceanobacillus</i> sp.	JN107799
CCH_CBGLBIRC (21)	<i>Pantoea agglomerans</i>	JN107800
CCH_CBGLBI5C (IS14)	<i>Pantoea agglomerans</i>	JN107789
CCH_CBGLBI6C (IS6)	<i>Pantoea agglomerans</i>	JN107790
CCH_CBGLBI25C (IIS4)	<i>Pantoea agglomerans</i>	JN107791

CCH_CBGLBI1S (IS7): Secuenciada con el iniciador 16S.

CCH_CBGLBI1C (IS7): Secuenciada con el iniciador Com.

12.2. Apéndice B. Fotografías de los aislados puros, del proceso de identificación de hongos y bacterias y de la bioprecipitación de cristales de carbonato de calcio por parte de los aislados bacterianos.

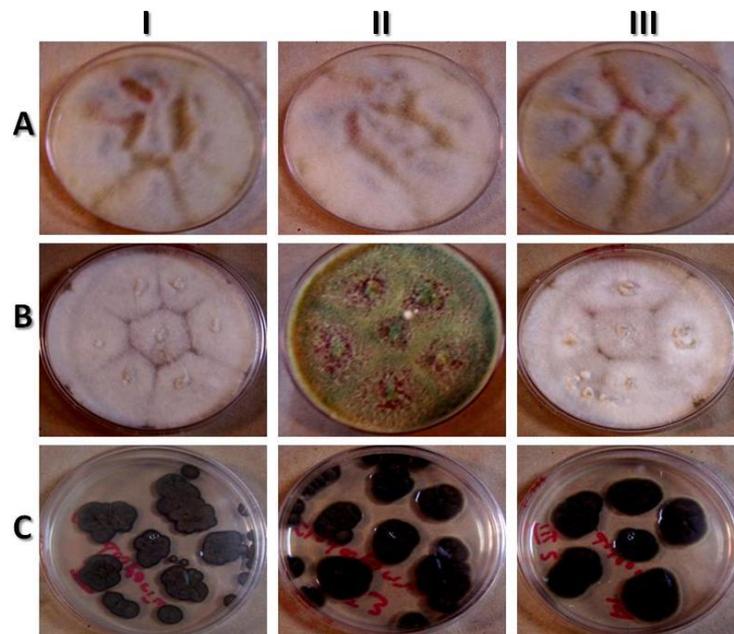


Figura 42. Hongos filamentosos pertenecientes a los géneros *Mucor*, *Trichoderma* y *Cladosporium*. AI-A3. *Mucor hiemalis*, BI. *Trichoderma viride*, BII. *Trichoderma harzianum*, B.III. *Trichoderma atroviride*, CI-CIII. *Cladosporium* sp.

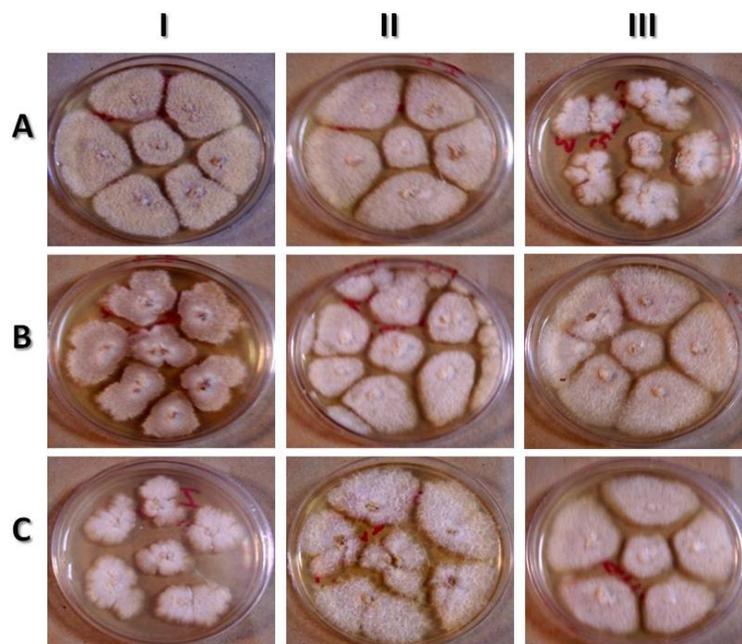


Figura 43. Hongos filamentosos pertenecientes al género *Fusarium*. AI-A3. *Fusarium* sp, BI-BIII. *Fusarium* sp, CI-CIII. *Fusarium* sp.

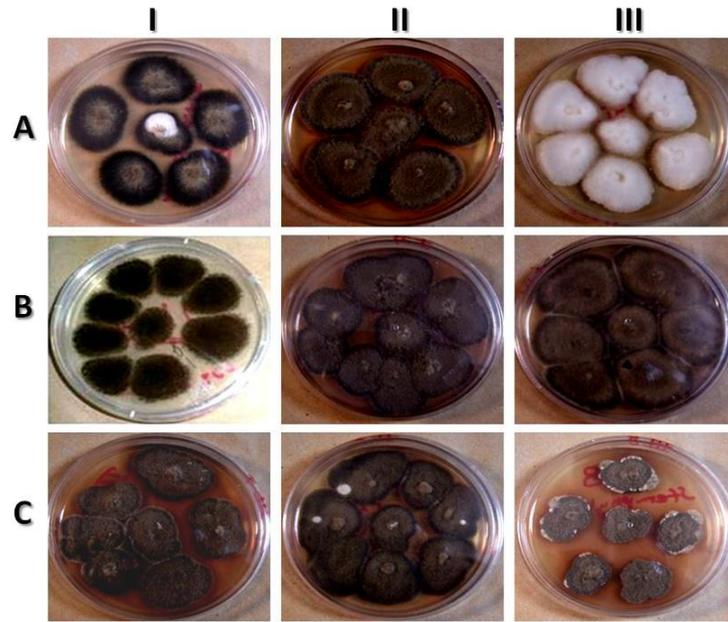


Figura 44. Hongos filamentosos pertenecientes a los géneros *Alternaria*, *Aspergillus* y *Stemphylium*. AI. *Alternaria tenuissima*, AII. *Alternaria* sp., AIII. *Aspergillus fumigatus*, BI. *Aspergillus niger*, BII-B.III. *Stemphylium* sp, CI-C.III. *Stemphylium* sp.

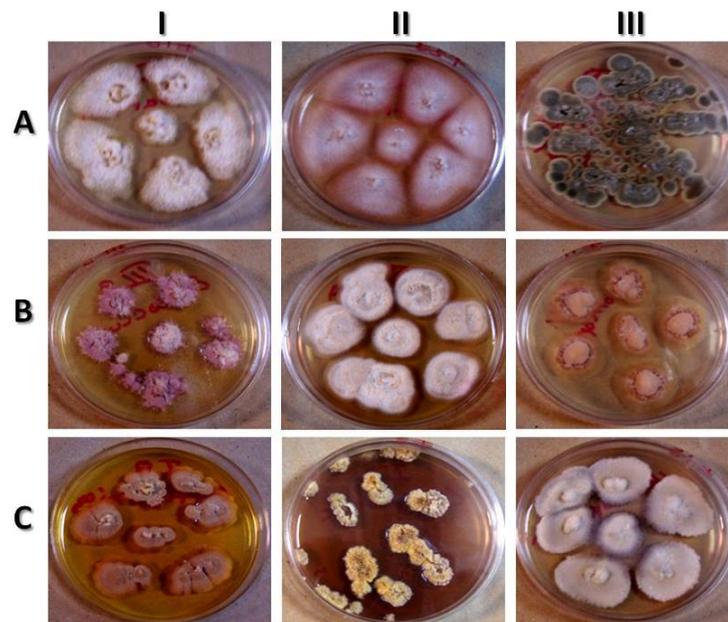


Figura 45. Hongos filamentosos pertenecientes a los géneros *Fusarium*, *Penicillium*, *Epicoccum*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Streptomiceto* y *Heliosporium*. AI. *Fusarium* sp., AII. *Fusarium solani*, AIII. *Penicillium* sp., BI. *Epicoccum* sp., BII. *Pestalotiopsis* sp, B.III. *Phomopsis* sp., CI y CII. *Streptomiceto* sp., C.III. *Heliosporium* sp.

Las figuras 42-45, nos dan una imagen de los diferentes aislados de hongos filamentosos que se obtuvieron durante el desarrollo de este trabajo. Con muchos de los aislados pertenecientes a la figura 45, como *Pestalotiposis*, *Steptomicetos* y *Helocosporium*, no se llegó a obtener la identidad por secuencia y por ello no fueron incluidos en etapas posteriores del estudio. El potencial biotecnológico de las diferentes especies obtenidas, se podría aun incrementar con el desarrollo de futuros trabajos tendientes a identificar molecularmente esos aislados.

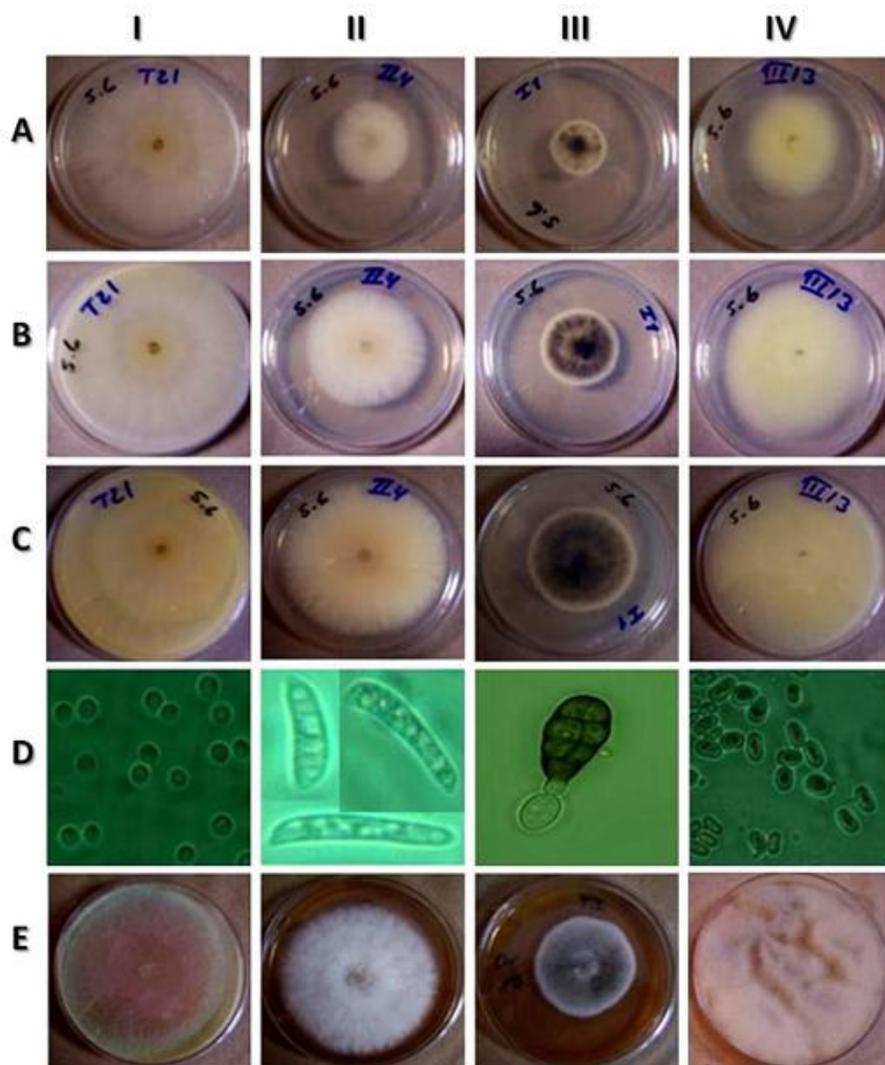


Figura 46. Hongos crecidos a pH 5.6, 48 y 72 horas de incubación. AI, BI. *Trichoderma harzianum*, AII, BII. *Fusarium* sp. , AIII, BIII. *Alternaria* sp. , AIV, BIV. *Mucor hiemalis* (48 y 72 horas). Esporas (D). DI. *Trichoderma harzianum* (72), DII. *Fusarium* sp. (120), DIII. *Alternaria* sp. (160), DIV. *Mucor hiemalis* (96). CI-EI. *Trichoderma harzianum*, CII-EII. *Fusarium* sp, CIII-EIII. *Alternaria* sp. , CIV-EIV. *Mucor hiemalis* (96 horas) (reverso y frente de la placa para todos).

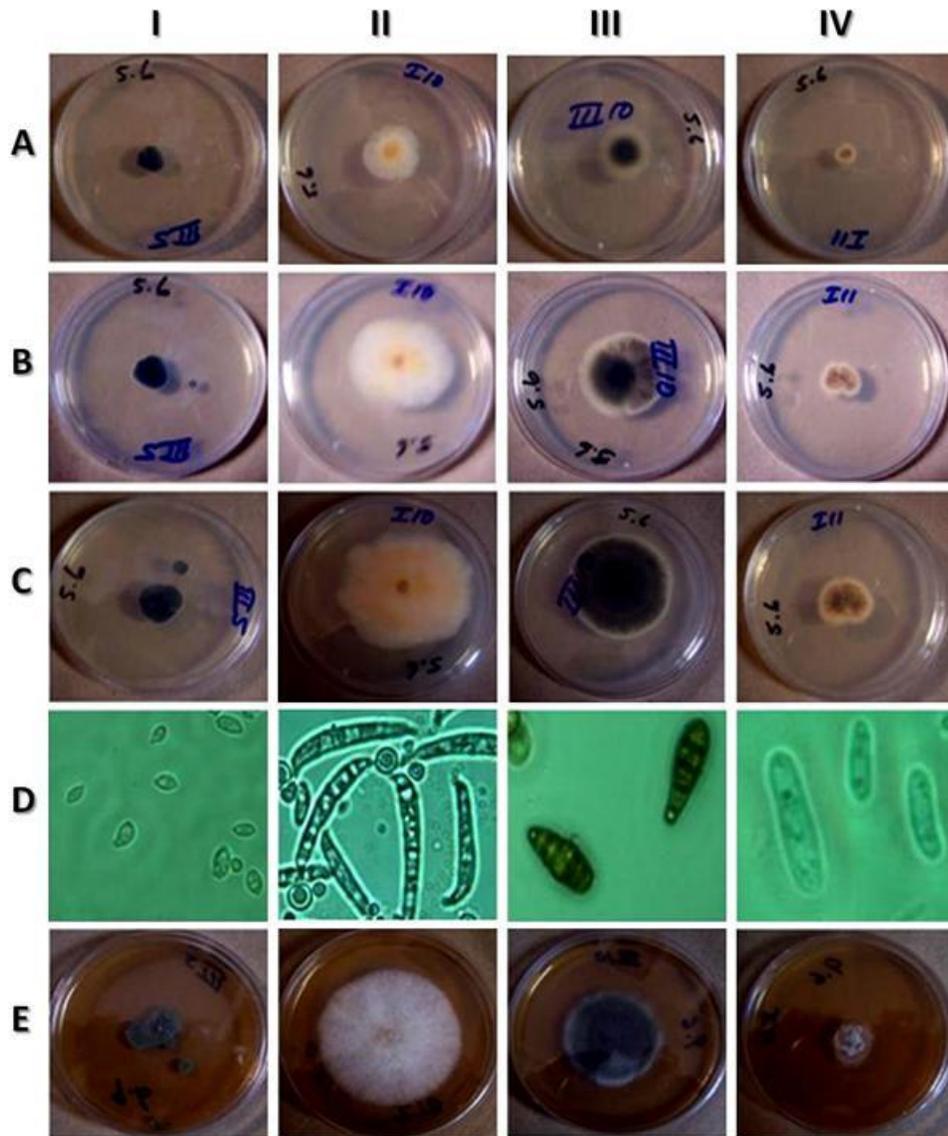


Figura 47. Hongos crecidos a pH 5.6, 48 y 72 horas de incubación AI, BI. *Cladosporium* sp, AII, BII. *Fusarium* sp , AIII, BIII. *Alternaria tenuissima*, AIV, BIV. *Phoma exigua* (48 y 72 horas). Esporas (D). DI. *Cladosporium* sp (120), DII. *Fusarium* sp (144), DIII. *Alternaria tenuissima* (96), DIV. *Phoma exigua* (240). CI-EI. *Cladosporium* sp, CII-EII. *Fusarium* sp, CIII-EIII. *Alternaria tenuissima* , CIV-EIV. *Phoma exigua* (96 horas) (reverso y frente de la placa)

Las figuras 46 y 47 nos dan una idea rápida del trabajo realizado, en este caso para el pH 5.6, para recabar toda la información correspondiente a la morfología de los hongos filamentosos, cuya información se presentó detallada en el cuadro 3. El mismo trabajo se realizó para pH como: 3.6, 7.6 y 9.6.

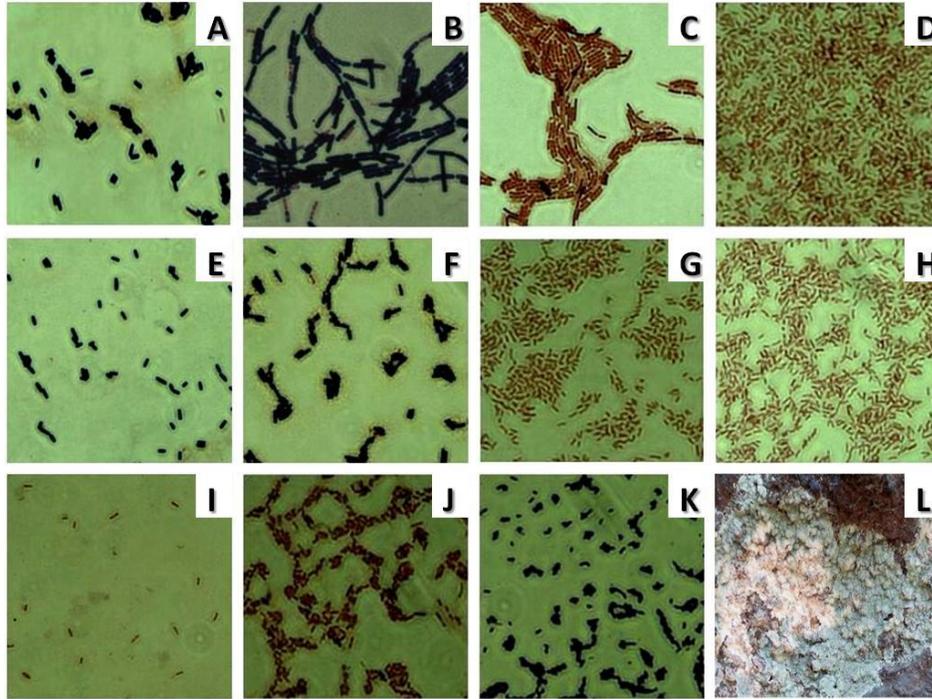


Figura 48. Prueba Gram para los aislados correspondientes al punto I.A, E, F, I. IS4, IS5, IS16, IS3. *Bacillus subtilis*; B. IS12 *Bacillus cereus*; C. IS6 *Pantoea agglomerans*; D, G, H . IS1, IS17, IS17a. *Pseudomonas sp*; J. IS8 *Bacillus pumilus*; K. IS2 *Arthrobacter sp* y L. Biopelícula localizada en el punto I.

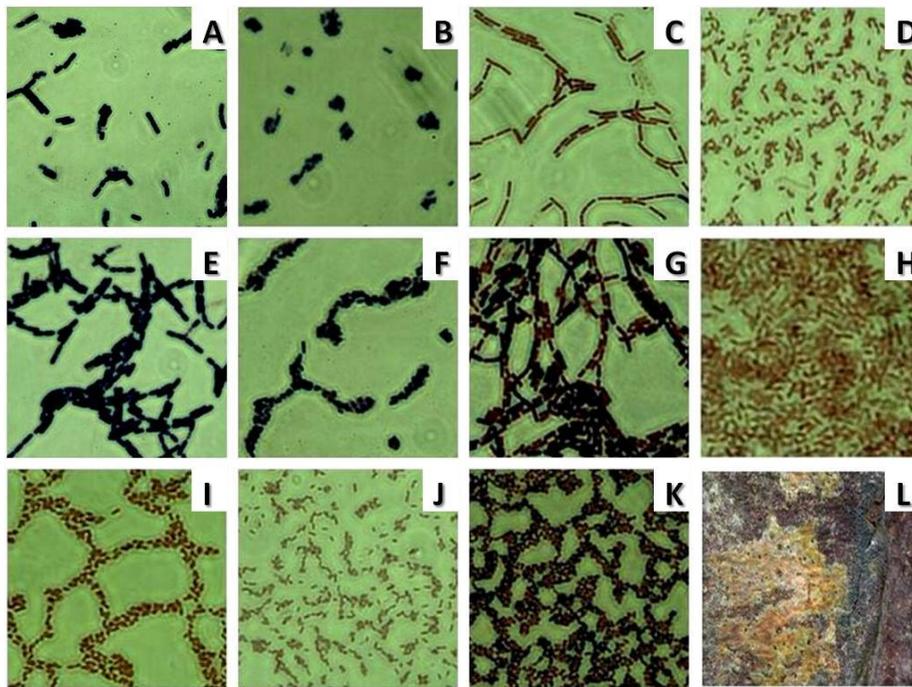


Figura 49. Prueba Gram para los aislados correspondientes al punto II.A, E. IIS17, IIS15a. *Bacillus cereus*; B, F, I. IIS10, IIS9, IIS2. *Bacillus pumilus*; C, G. IIS3, IIS12. *Bacillus simplex*; D. 27

Stenotrophomonas sp. ; *H. Bacillus psychrodurans*; J, K. IIS4, 21. *Pantoea agglomerans* y *L. Biopelícula* con signos de biomineralización encontrada en el punto II.

Las figuras 48 y 49 nos permiten ver la Gram variabilidad de los aislados obtenidos, al mismo tiempo que nos permiten tener una idea clara del tipo de microorganismo predominante en cada uno de los puntos muestreados.

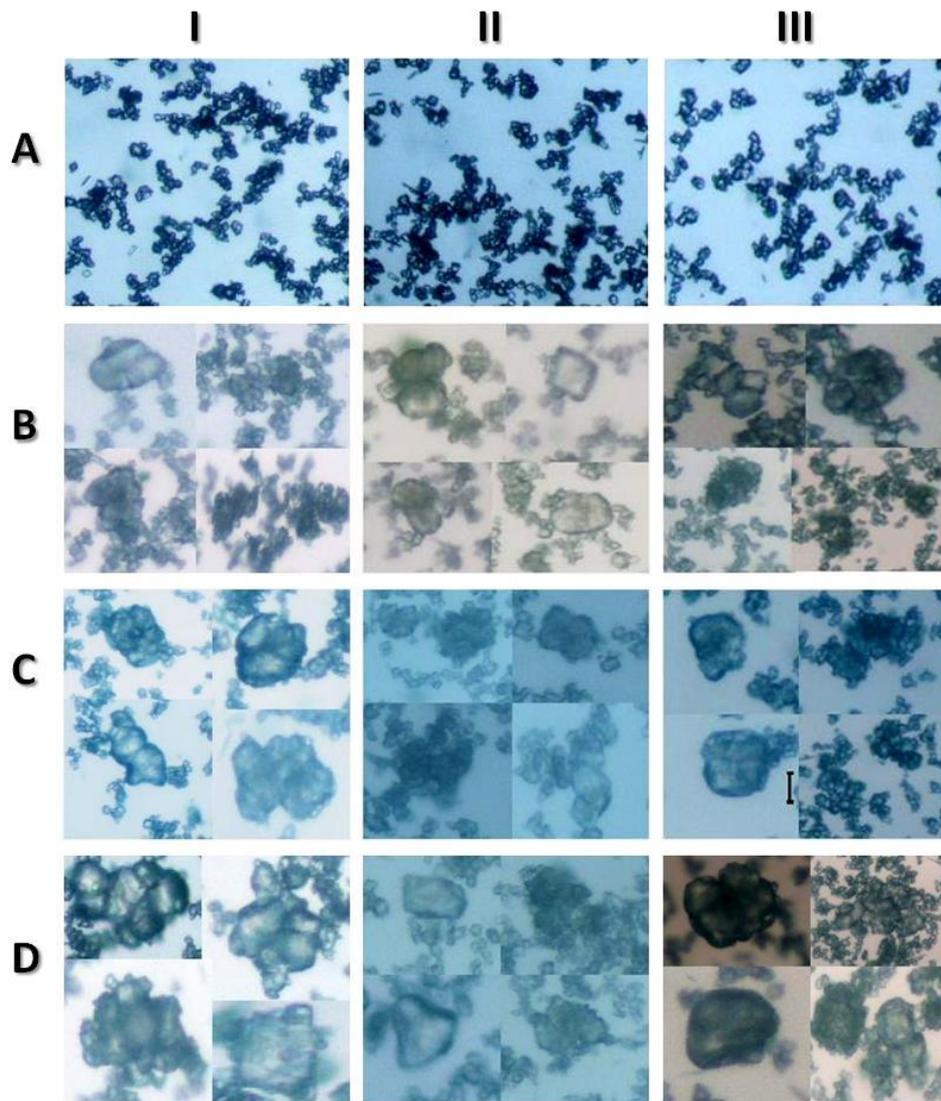


Figura 50. Cristales de carbonato de calcio a los 3,5 y 7 días respectivamente para las cepas que aportaron los mejores resultados en formación de biopelículas. AI.Control sin inocular, BI, CI y DI.Cepa IS16 (*Bacillus subtilis*) a los 3, 5 y 7 días. AII. Control sin inocular, BII, CII y DII. Cepa IIS15a (*Bacillus cereus*) a los 3, 5 y 7 días. AIII. Control sin inocular, BIII, CIII y DIII Cepa IIS10 (*Bacillus subtilis*) a los 3, 5 y 7 días.

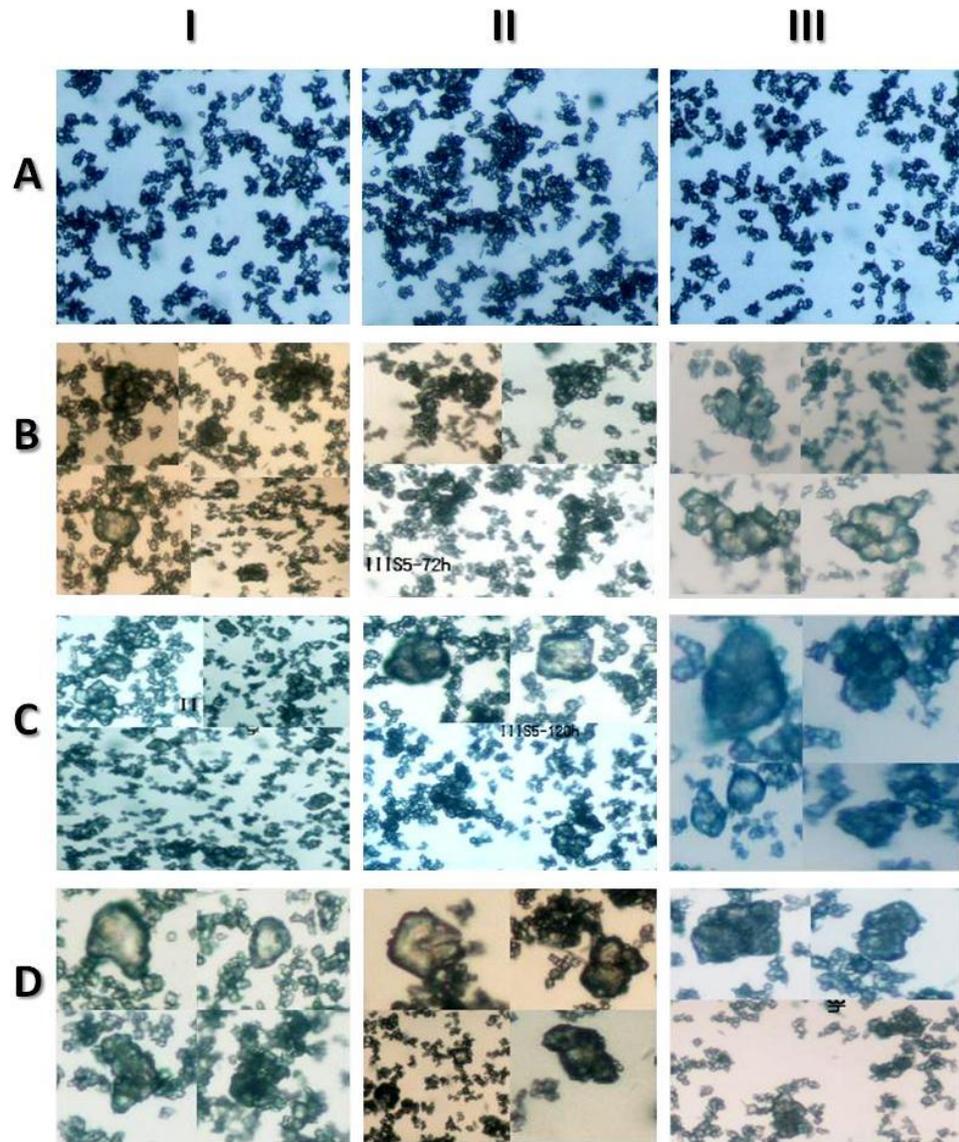


Figura 51. Cristales de carbonato de calcio a los 3, 5 y 7 días respectivamente para las cepas que aportaron los mejores resultados en bioprecipitación. AI. Control sin inocular, BI, CI y DI. Cella IIS4 (*Bacillus megaterium*) a los 3, 5 y 7 días. AII. Control sin inocular, BII, CII y DII. Cella IIS5 (*Bacillus simplex*) a los 3, 5 y 7 días. AIII. Control sin inocular, BIII, CIII y DIII. Cella IIS9b (*Bacillus subtilis*) a los 3, 5 y 7 días.

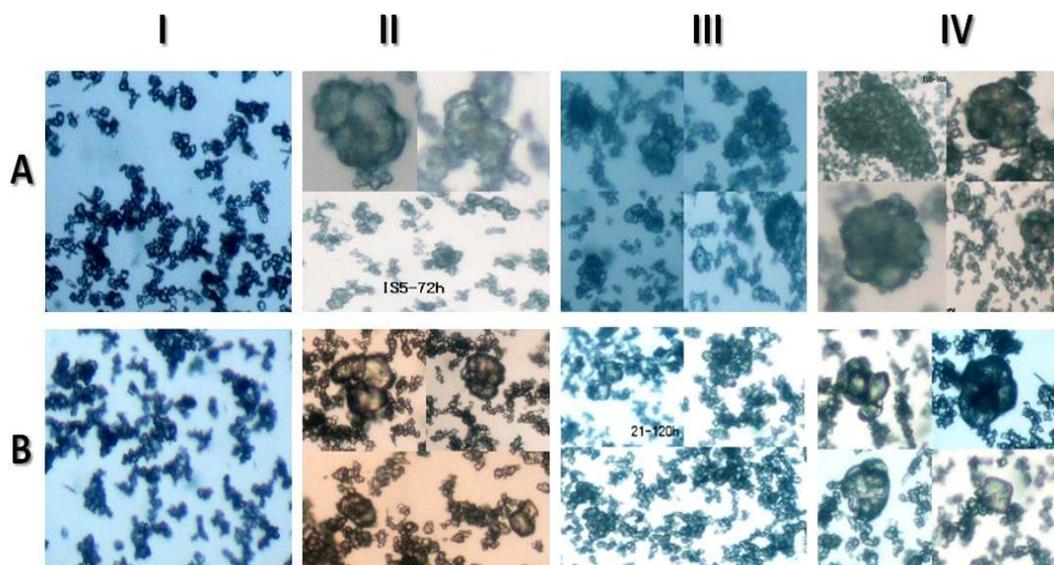


Figura 52. Cristales de carbonato de calcio a los 3, 5 y 7 días respectivamente para las cepas que aportaron los mejores resultados en bioprecipitación. AI.Control sin inocular, AII-AIV. Ceba IS5 (*Bacillus subtilis*) a los 3, 5 y 7 días. BI. Control sin inocular, BII-BIV. Ceba 21 (*Pantoea agglomerans*) a los 3, 5 y 7 días.

Las figuras 50, 51 y 52, complementan la información planteada en el cuerpo del trabajo, en el cual se planteó que los cristales formados a los 15 y 22 días respectivamente para los tres aislados que resultaron ser los mejores formadores de biopelículas (Figura 39) y para los cinco aislados que resultaron ser los mejores en cuanto a bioprecipitación de cristales de carbonato de calcio. De aquí que las figuras 50, 51 y 52, presenten los resultados para la formación de cristales a los 3, 5 y 7 días, respectivamente.

12.3. Apéndice C. Artículos elaborados a partir de la información generada por esta investigación.

12.3.1 Aislamiento e identificación de microorganismos en biopelículas provenientes del Castillo de Chapultepec, Ciudad de México.

Por: L.Páramo Aguilera, J. Narváez Zapata y E. De la Cruz.

Aceptado y publicado en la revista científica Nexo.24:83-91. Número 2. Diciembre 2011.

12.3.2 Culturable fungi associated with urban stone surfaces in Mexico City

Por: Páramo-Aguilera Leandro, Ortega-Morales Benjamín O and Narváez-Zapata José A.

Sometido a Journal Electronic Biotechnology y aceptado en correcciones menores.

12.3.3 Molecular diversity and biogeochemical activity potential of heterotrophic epilithic microflora

Por: Paramo-Aguilera, L.A; Ortega-Morales B.O., and Narváez-Zapata, J.A

Aun en proceso de corrección y por someter.

13. GLOSARIO

ADN. Acido Desoxirribonucleico: ácido nucléico formado por nucleótidos en los que el azúcar es desoxirribosa, y las bases nitrogenadas son adenina, timina, citosina y guanina. Excepto en los retrovirus que tienen ARN, el ADN codifica la información para la reproducción y funcionamiento de las células y para la replicación de la propia molécula de ADN. Representa la copia de seguridad o depósito de la información genética primaria, que en las células eucarióticas está confinada en la caja fuerte del núcleo.

Acido nucléico. Biomolécula formada por macropolímeros de nucleótidos, o polinucleótidos. Está presente en todas las células y constituye la base material de la herencia que se transmite de una a otra generación. Existen dos tipos, el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN).

Amortiguador. Soluciones de sustancias químicas que regulan la cantidad de iones de hidrógeno.

Bioedit. Es un programa informático de secuencias el cual permite la manipulación y análisis de múltiples secuencias y contiene aplicaciones que facilitan su alineamiento.

Biopelícula. Es un ecosistema microbiano organizado, conformado por uno o varios microorganismos asociados a una superficie viva o inerte, con características funcionales y estructuras complejas.

BLAST. Es un programa informático que emplea un algoritmo heurístico lleva a cabo un alineamiento de secuencias de tipo local, ya sea de ADN o de proteínas. El programa es capaz de comparar una secuencia problema (también denominada en la literatura secuencia query) contra una gran cantidad de secuencias que se encuentren en una base de datos.

Dendrograma. Tipo de representación gráfica o diagrama de datos en forma de árbol (Dendro=árbol) que organiza los datos en subcategorías que se van dividiendo en otros hasta llegar al nivel de detalle deseado (asemejándose a las ramas de un árbol que se van dividiendo en otras sucesivamente).

Electroforesis. Migración de partículas a través de una matriz polimérica bajo un gradiente de campo eléctrico.

Electroforesis en geles de agarosa. Se lleva a cabo en un gel de agarosa y se emplea para separar moléculas de ADN de entre 100 y 50kb en longitud. La migración del ADN en geles de agarosa depende de su tamaño y de la forma o arreglo de las moléculas.

Mega 4. Es una herramienta para trabajar con el alineamiento de secuencias manual y automáticamente para la realización de árboles filogenéticos empleando secuencias de las bases de datos, también estima rangos de evolución molecular y examinando las hipótesis evolutivas.

Monumento. Es toda obra, preferentemente arquitectónica, de justificado valor artístico, histórico o social.

Pares de bases. Dos nucleótidos opuestos y complementarios en las cadenas de ADN y ARN que están conectadas por puentes de hidrógeno.

PCR. Reacción en Cadena de la Polimerasa. Técnica de análisis del genoma mediante la amplificación ilimitada de porciones específicas del ADN. Es un método de amplificación exponencial del ADN por la intervención de una enzima termoestable, la Taq polimerasa, inventado por el norteamericano Kary Mullis en 1985.

Secuencia de ADN. Orden de encadenamiento de las bases nitrogenadas de los nucleótidos que constituyen el ADN y que cifra toda la información genética. Cuando es codificante (exón), define el orden de los aminoácidos que forman la proteína correspondiente.

Taq ADN polimerasa. Es una enzima que se extrae de la bacteria *Thermus aquaticus* para la replicación del ADN, es ampliamente utilizada por sus propiedades de termo resistencia en las reacciones de PCR.

OTU. Unidad Taxonómica Operativa, Son las unidades a clasificar. Actualmente existen numerosas especies procariotas descritas formalmente, sin embargo, aun no existe un consenso en la sistemática bacteriana para definir la unidad biológica fundamental de diversidad. En consecuencia, la mayoría de los trabajos microbiológicos basados en técnicas moleculares adoptan el concepto de “unidad taxonómica operativa” (OTU) para definir los taxones bacterianos de manera pragmática.

Tm. La temperatura de fusión, Tm, es la temperatura a la que la mitad de las moléculas complementarias se encuentran unidas. La Tm puede calcularse manualmente, siguiendo la regla de 2/4°C pero es mejor calcularla basándose en las propiedades termodinámicas de los pares de dinucleosidos

REP. (Repetitive Extragenic Palindromic) consiste de una secuencia repetida invertida de 33 bp altamente conservadas que está presente en alrededor de 500 copias dispersas alrededor de los cromosomas tanto en *Escherichia coli* como en *Salmonella typhimurium* (Ster *et al.*, 1984; Gilson *et al.*, 1984)

ERIC. (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) está integrada por 126 bp de longitud y no tiene similitud de secuencia con las secuencias *rep*, sin embargo, algunas de las características de las secuencias *eric* y *rep* son similares y ellas pueden ser mantenidas en el genoma bacteriano por mecanismos similares (Hulton *et al.*, 1991)

Bootstrap. También llamada estimación de Monte Carlo es un método de re muestreo no paramétrico propuesto por Bradley Efron en 1979. La idea central de este método es simple; dada una muestra aleatoria con n observaciones dicha muestra es tratada como si fuera toda la población de la cuál extraeremos B muestras con re emplazamiento.

Dot. Representa la identidad nucleotídica al detenerse la secuencia consenso.

Cebador o iniciador. Pequeña cadena de nucleótidos a partir de la cual la ADN polimerasa inicia la síntesis de una molécula nueva de ADN.

Clados. En biología, se llama clado a cada una de las ramas del árbol filogenético propuesto para agrupar a los seres vivos. Por consiguiente, un clado se interpreta como un conjunto de especies emparentadas (con un antepasado común).

Bioprecipitación. Acción de depositarse en el fondo de un recipiente la parte sólida que está suspendida en el líquido de una disolución, entonces la bioprecipitación se refiere a la realización de esta función por parte de organismos vivos.

Prueba de ureasa. Determina la capacidad de un organismo de desdoblar la urea formando dos moléculas de amoníaco por acción del enzima ureasa. Esta actividad enzimática es característica de todas las especies de *Proteus* y se usa sobre todo para diferenciar este género de otras enterobacterias que dan negativo o positivo retardado.

Difracción de Rayos X. Está basada en las interferencias ópticas que se producen cuando una radiación monocromática atraviesa una rendija de espesor comparable a la longitud de onda de la radiación. Los Rayos X tienen longitudes de onda de Angstroms, del mismo orden que las distancias interatómicas de los componentes de las redes cristalinas. Al ser irradiados sobre la muestra a analizar, los Rayos X se difractan con ángulos que dependen de las distancias interatómicas. El método analítico del Polvo al Azar o de Debye-Scherrer consiste en irradiar con Rayos X sobre una muestra formada por multitud de cristales colocados al azar en todas las direcciones posibles. Para ello es aplicable la Ley de Bragg: $n\lambda = 2d \cdot \text{sen}\theta$, en la que "d" es la distancia entre los planos interatómicos que producen la difracción.

Microscopia Electrónica de Barrido. El Microscopio electrónico de barrido o SEM (Scanning Electron Microscope), es aquel que utiliza un haz de electrones en lugar de un haz de luz para formar una imagen. Tiene una gran profundidad de campo, la cual permite que se enfoque a la vez una gran parte de la muestra. También produce imágenes de alta resolución, que significa que características espacialmente cercanas en la muestra pueden ser examinadas a una alta magnificación

Espectrograma. Representación visual de las variaciones de la frecuencia en el eje vertical, y de la intensidad mediante los niveles de colores o grises del sonido que se está representando a lo largo del tiempo que se representa en el eje horizontal.

Calcita, aragonita y whewellita. Los carbonatos de calcio, producto de la cristalización en fluidos sobresaturados con iones de calcio, pueden adoptar diferencias en las estructuras de sus cristales, en otras palabras, mantienen sus átomos componentes, aunque sus distribuciones espaciales difieren significativamente. Básicamente se clasifican en dos formas distintas: calcita y aragonita (**CaCO₃**). La whewellita (oxalato de calcio) es un biomineral de calcio que cristaliza en las células de las plantas

Biocontrol. El control biológico es un método de control de plagas, enfermedades y malezas que consiste en utilizar organismos vivos con objeto de controlar las poblaciones de otro organismo.

Bioestimulantes. Formulados para estimular a la planta de forma específica en cada momento. Permiten provocar cambios fisiológicos en el momento adecuado según las necesidades.

Biodeterioro. Es un fenómeno complejo que implica alteraciones de las propiedades físico-químicas y mecánicas del material por acción de organismos biológicos. A ello hay que añadir las modificaciones del aspecto estético que se producen en los objetos afectados. La intensidad de las alteraciones, se produce en función de los componentes de los soportes y de las condiciones ambientales.

Matriz EPS. Sustancias poliméricas extracelulares asociadas, sirven como un punto de inicio útil para investigar como las moléculas orgánicas influyen los procesos de precipitación